

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**EFFECTO DE LOS MEDIADORES METABÓLICOS  
LEPTINA, IL-6 Y ESTRADIOL EN LA ACTIVACIÓN  
MICROGLIAL E IMPLICACIÓN EN LA  
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA EN DIFERENTES  
MODELOS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA  
CRÓNICA**

Memoria para optar al grado de Doctor en la UAM de la licenciada

**SILVIA TAPIA GONZÁLEZ**

**DIRECTORES:**

Dra. Julie Ann Chowen King  
Prof. Dr. Luis Miguel García Segura

Madrid, 2010



Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2002-00652, SAF 2005- 00272), del FIS (PI070182), de la Unión Europea (proyecto Estrogens and Women Ageing: Specific Targeted Research Project-UE) y al CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (Instituto de Salud Carlos III).

Agradezco enormemente haber recibido financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI, ref. BES-2003-2096) y del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (Instituto de Salud Carlos III).

El trabajo de esta Tesis ha sido realizado en el laboratorio del Prof. Dr. Luis Miguel García Segura en el Instituto Cajal (Madrid) y en el laboratorio de la Dra. Julie Ann Chowen y el Prof. Dr. Jesús Argente, en el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid).

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>06</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>1. LA COMUNICACIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNE PERIFÉRICO Y EL CEREBRO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. FUNCIONES DE LAS CITOQUINAS EN EL SNC.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MODULADORES NEUROENDOCRINOS E INMUNES.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 La leptina.....</b>	<b>19</b>
La fisiología de la leptina y su receptor.....	19
El papel de la leptina en la regulación metabólica.....	23
La acción de la leptina en la inmunidad.....	24
La leptina y el sistema reproductor.....	24
<b>3.2 La IL-6.....</b>	<b>25</b>
La fisiología de la IL-6 y su receptor.....	25
Funciones fisiológicas de la IL-6.....	28
La IL6 y el sistema nervioso y endocrino.....	29
La IL-6 y la reproducción.....	30
<b>3.3 El estradiol.....</b>	<b>30</b>
Mecanismos de acción de las hormonas sexuales en el SNC.....	31
Estructura y función de los receptores de estrógeno.....	33
El estradiol en la fisiología reproductiva.....	34
El papel neuroprotector y antiinflamatorio del estradiol en el SNC.....	35
La función metabólica del estradiol.....	35
<b>4. SERMS: MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO.....</b>	<b>37</b>
<b>5. LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN EL SNC.....</b>	<b>38</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO.....</b>	<b>46</b>
1.1 Muestras de tejido cerebral de rata.....	46
1.2 Líneas celulares.....	46
<b>2. PROTOCOLOS GENERALES.....</b>	<b>47</b>
2.1 Ovariectomía.....	47
2.2 Implantación de minibombas osmóticas.....	47
2.3 Diseño experimental.....	48
• MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	48
2.3.1 Modelo de sobrenutrición postnatal.....	48
2.3.2 Modelo de tratamiento crónico con leptina intracerebroventricular ( <i>icv</i> ).....	49
2.3.3 Modelo de inflamación <i>in vivo</i> .....	50
• MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	53
2.3.3 Modelo de inflamación <i>in vitro</i> .....	53
2.4 Procesamiento de los tejidos.....	54
2.4.1 Perfusión.....	54
2.4.2 Congelación.....	55
2.5 Inmunohistoquímica y tinciones celulares.....	55
2.5.1 Marcaje simple por inmunoperoxidasa.....	55
2.5.2 Marcaje doble por inmunoperoxidasa frente a IL6-R $\alpha$ y MCH.....	56
2.5.3 Inmunohistoquímica doble por fluorescencia.....	57
2.5.4 Controles de especificidad.....	57
2.5.5 Tinción con verde de metilo.....	57
2.6 Métodos de valoración y cuantificación.....	59
2.6.1 Análisis morfométrico: La técnica del disector óptico.....	59
2.6.2 Análisis estereológico en el modelo de sobrenutrición postnatal.....	59
• Células MHC-II inmunorreactivas.....	59
• Células IL-6R $\alpha$ inmunorreactivas.....	60
• Células IL-6R $\alpha$ y MCH inmunorreactivas.....	60
2.6.3 Análisis estereológico en el modelo de tratamiento crónico con leptina ( <i>icv</i> ).....	61
• Células MHC-II inmunorreactivas.....	61
2.6.4 Análisis estereológico en el modelo de inflamación <i>in vivo</i> .....	61
• Células OX-42 y MHC-II inmunorreactivas.....	61
• Células IL-6R $\alpha$ inmunorreactivas.....	61

• Células OX-42 inmunorreactivas que presentan el ER $\alpha$ .....	62
<b>2.7 Obtención de proteínas.....</b>	<b>62</b>
2.7.1 Tejido.....	62
2.7.2 Línea celular BV-2.....	63
<b>2.8 Electroforesis y Western blotting.....</b>	<b>63</b>
<b>2.9 Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y PCR cuantitativa en tiempo real.....</b>	<b>65</b>
2.9.1 Oligonucleótidos cebadores empleados.....	66
<b>2.10 Técnica ELISA para la determinación de la leptina sérica.....</b>	<b>67</b>
<b>3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>67</b>
 <b>RESULTADOS.....</b>	 <b>69</b>
 <b>1. MODELO DE SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL.....</b>	 <b>70</b>
<b>1.1 Efecto de la sobrenutrición postnatal en el incremento de peso de ratas macho.....</b>	<b>70</b>
<b>1.2 Efectos del sobrepeso en las células de microglía.....</b>	<b>70</b>
1.2.1 Microglía inmunorreactiva para el MHC-II en el hipotálamo.....	70
1.2.2 Microglía inmunorreactiva para el MHC-II en el cerebelo.....	73
<b>1.3 Efectos del sobrepeso sobre la IL-6 y el IL-6R<math>\alpha</math>.....</b>	<b>75</b>
1.3.1 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ en el hipotálamo.....	75
1.3.2 Distribución del IL-6R $\alpha$ en el hipotálamo.....	75
1.3.3 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ en el cerebelo.....	80
1.3.4 Distribución de la IL-6 en el cerebelo.....	81
1.3.5 Distribución del IL-6R $\alpha$ en el cerebelo.....	82
<b>1.4 Localización de la inmunorreactividad del IL-6R<math>\alpha</math> en las neuronas MCHérgicas del hipotálamo.....</b>	<b>84</b>
 <b>2. MODELO DE TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA (ICV).....</b>	 <b>86</b>
<b>2.1 Efectos de la leptina en el hipotálamo.....</b>	<b>86</b>
2.1.1 Microglía inmunorreactiva para MHC-II.....	86
2.1.2 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ .....	87
2.1.3 Niveles de los receptores de estrógeno.....	88

<b>2.2 Efectos de la leptina en el cerebelo.....</b>	<b>88</b>
2.2.1 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ .....	88
2.2.2 Niveles de los receptores de estrógeno en el cerebelo.....	89
<b>3. MODELO DE INFLAMACIÓN <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1 Efectos del LPS y la leptina en las células BV-2.....</b>	<b>90</b>
3.1.1 Niveles de COX-2 y PCNA.....	90
3.1.2 Niveles del IL-6R $\alpha$ .....	92
3.1.3 Expresión del gen de la IL-6.....	92
3.1.4 Niveles de SOCS-3.....	93
3.1.5 Niveles del ER $\beta$ .....	94
<b>3.2 Efectos del LPS y el estradiol en las células BV-2.....</b>	<b>95</b>
3.2.1 Niveles de COX-2 y PCNA.....	95
3.2.2 Niveles del IL-6R $\alpha$ .....	97
3.2.3 Expresión del gen de la IL-6.....	97
3.2.4 Niveles del ER $\beta$ .....	98
<b>3.3 Efectos de la IL-6 y el estradiol en las células BV-2.....</b>	<b>99</b>
3.3.1 Niveles del IL-6R $\alpha$ .....	99
3.3.2 Niveles del ER $\beta$ .....	100
<b>3.4 Efectos de la leptina y el estradiol en las células BV-2.....</b>	<b>101</b>
3.4.1 Niveles del IL-6R $\alpha$ .....	101
<b>4. MODELO DE INFLAMACIÓN <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>102</b>
<b>4.1 Efecto del LPS sobre el peso corporal y los niveles de leptina.....</b>	<b>102</b>
<b>4.2 Modulación de la IL-6 y el IL-6R<math>\alpha</math> en el cerebelo.....</b>	<b>103</b>
4.2.1 Efectos del LPS y de compuestos estrogénicos sobre las células inmunorreactivas para la IL-6.....	103
4.2.2 Efectos del LPS y de compuestos estrogénicos sobre las células inmunorreactivas para la IL-6R $\alpha$ .....	105
<b>4.3 Modulación de la activación microglial en el cerebelo.....</b>	<b>108</b>
4.3.1 Efectos del LPS sobre la microglía.....	108
4.3.2 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas macho.....	109
4.3.3 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas hembra, iniciando el tratamiento una semana después de la ovariectomía.....	112
4.3.4 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas hembra, iniciando el tratamiento 1 mes después de la ovariectomía.....	115
4.3.5 Expresión de los receptores de estrógeno en la microglía.....	118

4.3.6 Efectos de los agonistas de los receptores de estrógeno PPT y DPN sobre la microglía.....	121
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>1. MODELO DE SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL Y DE TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA (ICV).....</b>	<b>124</b>
La microglía se activa en el cerebro de ratas con sobrepeso.....	124
La leptina induce la activación microglial hipotalámica.....	127
El sobrepeso y la leptina <i>icv</i> causan variaciones en los niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ en el cerebro.....	131
La distribución del IL-6R $\alpha$ sufre alteraciones en el cerebro de las ratas con sobrepeso.....	136
El sobrepeso incrementa la densidad de neuronas MCHérgicas/IL-6R $\alpha$ en la ZI.....	138
La leptina modula al ER $\alpha$ en el hipotálamo y el cerebelo.....	139
<b>2. MODELO DE INFLAMACIÓN <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>141</b>
Efectos del LPS y la leptina en las células BV-2.....	141
Efectos del LPS y del estradiol en las células BV-2.....	144
<b>3. MODELO DE INFLAMACIÓN <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>147</b>
Efecto del LPS sobre el peso corporal y los niveles de leptina.....	147
Modulación de la IL-6 y el IL-6R $\alpha$ en el cerebelo.....	149
La modulación de la activación microglial en el cerebelo.....	152
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>

## **ABREVIATURAS**

%GCs: porcentaje de guaninas-citosinas  
17 $\beta$ -HSD: óxido-reductasa de los 17  $\beta$ -hidroxiesteroides  
3 $\alpha$ -HSD: óxido-reductasa de los 3  $\alpha$ -hidroxiesteroides  
3 $\beta$ -HSD: óxido-reductasa de los 3  $\beta$ -hidroxiesteroides  
ABC: complejo de avidina-biotina peroxidada  
ACh: acetilcolina  
ACTH: hormona adrenocorticotropina  
AD: 4-androstenodiona  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AgRP: proteína relacionada con Agoutí  
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico  
AP: área postrema  
APP: proteína precursora amilácea  
APPs: proteínas de fase aguda en el hígado  
Arc: núcleo arcuato  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
BBB: barrera hematoencefálica  
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro  
bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico  
BSA: albúmina sérica bovina  
CART: transcrito regulado por cocaína-anfetamina  
CCK: colecistoquinina  
CD-200: antígeno derivado del clon 200  
CD-200R: receptor de CD200  
cDNA: ADN complementario  
CNTF: factor neurotrófico ciliar  
COX-2: ciclooxigenasa -2  
CRH: hormona liberadora de corticotropina  
CSF: líquido cefalorraquídeo  
CT-1: cardiotropina 1  
CTB: toxina del cólera B  
CVOs: órganos circunventriculares  
CYP11A (P450 scc): citocromo P450 que corta la cadena lateral del colesterol  
CYP17 (P450 c17): citocromo P450 con actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa / 17, 20 liasa;  
CYP7B1: citocromo P450 con actividad hidroxicoolesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa  
Cyp-40: ciclofilina 40  
DA: área hipotalámica dorsal  
DAB: diaminobencidina  
DBD: dominio de unión al ADN  
DHEA: dehidroepiandrosterona  
DMC: parte compacta del núcleo dorsomedial  
DMD: parte dorsal del núcleo dorsomedial  
DMN: núcleo dorsomedial  
DMNV: núcleo motor dorsal del vago  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DMV: parte ventral del núcleo dorsomedial



DnaJ/HSP-40: proteína de choque térmico 40  
dNTPs: desoxinucleótidos fosfato  
DPN: 2,3-bis (hidroxifenil) propionitrilo  
DVC: complejo dorsal vagal  
EBA: antígeno de la barrera endotelial  
EM: eminencia media  
ERE: elemento de respuesta a estrógenos  
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares  
ERs: receptores de estrógenos  
ER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$   
ER $\beta$ : receptor de estrógenos  $\beta$   
FSH: hormona folículo estimulante  
GABA: ácido  $\gamma$ - aminobutírico  
G-CSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos  
G-CSFR: receptor de G-CSF  
GH: hormona del crecimiento  
GLP-1: péptido del tipo glucagón 1  
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina  
GR: receptor de glucocorticoides  
hER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$  humano  
hER $\beta$ : receptor de estrógenos  $\beta$  humano  
HPA: eje hipotalámico-hipofisario-adrenal  
HPG: eje hipotalámico-pituitario-gonadal  
HSP-70: proteína de choque térmico 70  
HSP-90: proteína de choque térmico 90  
HSPs: proteínas de choque térmico  
icv: intracerebroventricular  
IGF-1: factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I  
IL-1, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 18: interleuquinas 1, 6, 8, 10, 11, 12, 15 o 18  
IL-6R: receptor de IL-6  
IL-6Rs: receptor de IL-6 soluble  
IL-6R $\alpha$  (gp80): subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-6  
IL-6R $\beta$  (gp130 ó IL-6 ST): subunidad  $\beta$  del receptor de IL-6  
IL-8R : receptor de IL-8  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
IRS: proteína del sustrato del receptor de insulina  
JAK-2: proteína tirosina quinasa intracelular tipo 2 de la familia de las *Janus* quinasas  
JAKs: proteínas tirosín quinasa intracelulares de la familia de las *Janus* quinasas  
JNK: quinasa N-terminal de jun  
LBD: dominio de unión al ligando  
LC1: lipocortina 1  
LH: hormona luteinizante  
LHA: área hipotalámica lateral  
LIF: factor inhibidor de leucemia  
LIFR: receptor del factor inhibidor de leucemia  
LPS: lipopolisacárido bacteriano  
LTB4: leucotrieno B4  
MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos  
MC3-R, MC4-R, MC5-R: receptores de melanocortina MC3, MC4 o MC5  
MCH: hormona concentradora de melanina

MCP-1: proteína quimotáctica de monocitos-1  
MHC-II: complejo de histocompatibilidad de clase II  
MPOA: área preóptica media  
MR: receptor de mineralocorticoides  
NA: noradrenalina  
NF-IL-6: factor nuclear controlador de la expresión del gen de la IL-6  
NF- $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B  
NGF: factor de crecimiento nervioso  
NGS: suero de cabra  
NMDA: N-metil D aspartato  
NPY: neuropéptido Y  
NR: receptores nucleares  
Nt: extremo N- terminal  
NT-3: neurotrofina-3  
NTD: dominio amino N-terminal  
NTS: núcleo del tracto solitario  
ObR: receptor de leptina  
ObRa, b, c, d, e, f: isoformas del receptor de leptina a, b, c, d, e, f  
OBR<sub>L</sub>: isoforma larga del receptor de leptina  
OBR<sub>S</sub>: isoforma corta del receptor de leptina  
OSM: oncostatina  
OSMR: receptor de oncostatina  
OVL: órgano vascular de la lámina terminalis  
OX: quiasma óptico  
OXA: orexina-A  
PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria  
PaDC: cápsula dorsal del núcleo paraventricular  
PaLM: parte magnocelular lateral del núcleo paraventricular  
PaMP: parte parvicelular medial del núcleo paraventricular  
PaV: parte ventral del núcleo paraventricular  
PB: núcleo parabraquial  
PBS: tampón fosfato salino  
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
Pe: área periventricular  
PFA: área perifornical  
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa  
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
POA: área preóptica  
POMC: proopiomelanocortina  
PP: polipéptido pancreático  
PPT: 4,4',4''-(4-Propil-[1H] pirazol-1,3,5-triil) trisfenol  
PR: receptor de la progesterona  
PRL: prolactina  
PTP-1B: proteína fosfatasa 1B  
PVDF: difluoruro de polivinilo  
PVN: núcleo paraventricular  
PYY: péptido tirosina-tirosina  
ROS: especies de oxígeno reactivo  
RT: retrotranscripción

RT-PCR: retrotranscripción seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa  
Sch: núcleo supraquiasmático  
SDS: dodecil sulfato sódico  
seEM: capa subependimal de la EM  
SERMs: moduladores selectivos de los receptores de estrógeno  
SFO: órgano subfornical  
SHP-2: proteína tirosina fosfatasa con dominios de homología 2 de Src  
SNC: sistema nervioso central  
SO: núcleo supraóptico  
SOCS-3: proteínas supresoras de la señalización de citoquinas de tipo 3  
STAT-1, 3, 5 o 6: transductor de la señal y activador de la transcripción tipo 1, 3, 5 o 6  
STATs: transductores de señal y activadores de la transcripción  
TfR: receptor de transferrina  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  
TLRs: receptores tipo Toll  
Tm: temperatura de disociación  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
TRH: hormona liberadora de tirotropina  
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana  
VIP: péptido intestinal vasoactivo  
VLM: médula ventrolateral  
vm-Arc: zona más ventral del Arc  
VMN: núcleo ventromedial  
VMNC: parte central del núcleo ventromedial  
VMNDM: parte dorsomedial del núcleo ventromedial  
VMNVL: parte ventrolateral del núcleo ventromedial  
VPA: ácido valproico  
ZI: zona incerta  
 $\alpha$ -MSH: hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$   
 $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH y  $\gamma$ -MSH: hormona  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  estimulante de melanocitos

# INTRODUCCIÓN

El balance energético está regulado por mecanismos homeostáticos que están controlados por el sistema digestivo, el tejido adiposo y el cerebro, particularmente el hipotálamo. La regulación periférica incluye señales humorales de adiposidad, que informan al cerebro de la masa de tejido adiposo, y señales de saciedad, mientras que el control a nivel central implica varios sistemas, como el neuropeptidérgico, el monoaminérgico y el sistema de endocannabinoides (Valassi y cols., 2008).

Durante la ingesta, las señales de saciedad originadas en el tracto gastrointestinal, llegan al SCN vía sistémica o a través del nervio vago, alcanzando el núcleo del trato solitario (NTS). Desde el NTS se proyectan fibras aferentes al núcleo arqueado o arcuato (Arc), en donde se integran las señales de saciedad con las de adiposidad, leptina e insulina (Hillebrand y cols., 2010) junto con las procedentes de áreas suprahipotalámicas y otros núcleos hipotalámicos, creando una red compleja de circuitos neuronales que finalmente, elaboran una respuesta integrada desencadenada por la ingesta (Valassi y cols., 2008).

Entre los factores orexigénicos y anorexigénicos más conocidos que regulan el comportamiento de la ingesta en humanos y roedores se encuentran (Tritos y cols., 2003): 1) la insulina (Schwartz y cols., 1992; Bray, 2000); 2) la glucosa (Nijima, 1983); 3) los ácidos grasos, lipoproteínas y cetonas (Langhans y cols., 1985; Fisler y cols., 1989, 1995), todos ellos considerados señales de saciedad; 4) los péptidos procedentes del sistema digestivo inhibidores del apetito, como el péptido tirosina-tirosina (PYY), la oxintomodulina, el polipéptido pancreático (PP), el péptido del tipo glucagón 1 (GLP-1) y la colecistoquinina (CCK) (Tritos y cols., 2003; Chaudhri y cols., 2006; Morton y cols., 2006; Crespo y cols., 2009), y la ghrelina, un péptido estimulador de la ingesta; 5) péptidos activos endocrinos, o adipoquinas, procedentes del tejido adiposo, con función anorexigénica, como la leptina, la adiponectina, resistina, las interleuquinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Kershaw y Flier, 2004; Fain, 2006; Iannone and Lapadula, 2010); 6) el estradiol y otras hormonas esteroideas (Ahima y cols., 2006); 7) neuropéptidos que se expresan en el sistema nervioso central (SNC), que incluyen péptidos anorexigénicos como la proopiomelanocortina y el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (POMC y CART) en el Arc, péptidos derivados de POMC, como la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$  y  $\beta$ -MSH) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) en

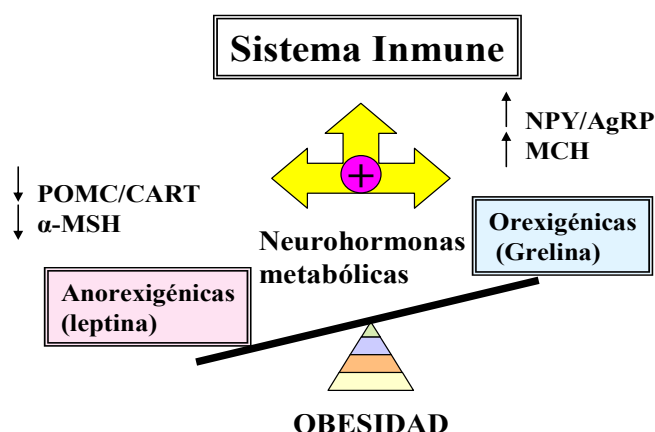
el núcleo ventromedial (VMN), y neuropéptidos orexigénicos como el péptido relacionado con la proteína Agoutí y el neuropéptido Y (AgRP y NPY) en el Arc (Elias y cols., 1999; Beck y cols., 2000; Korner y cols., 2001; Horvath, 2005; Segal y cols., 2005; Kurrasch y cols., 2007; Santos, 2009).

Otros péptidos involucrados en el control de la ingesta, con función anorexigénica, son: la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el núcleo paraventricular (PVN), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la oxitocina. Como señales estimuladoras de la ingesta también participan la hormona concentradora de melanina (MCH) y la orexina-A (OXA) (Williams y cols., 2004) en el área hipotalámica lateral (LHA) y en el área perifornical (PFA) (Valassi y cols., 2008).

La obesidad se produce cuando, durante un periodo de tiempo, la energía ingerida es superior al gasto energético. En un sujeto normal los niveles de leptina e insulina se elevan para provocar una respuesta neuronal que reduzca la ingesta, incrementando el gasto energético y evitando la expansión patológica del tejido graso (Seeley y cols., 1996). Este mecanismo parece estar alterado en las formas comunes de obesidad humana y en los modelos en roedores de obesidad inducida por la dieta, en los que se produce un consumo excesivo de comida apetecible, produciéndose la pérdida de la homeostasis energética (Posey y cols., 2009). En estos tipos de obesidad, el incremento de tejido graso va acompañado por la elevación en el plasma de los niveles de la leptina y la insulina, mientras que la ingesta de alimentos puede permanecer normal o elevada (Levin y Dunn-Meynell, 2002). Esto sugiere que la obesidad inducida por la dieta se caracteriza por la adquisición de una resistencia funcional del SNC a la insulina (De Souza y cols., 2005) y a la leptina (Munzberg y cols., 2004). La señalización defectuosa de la leptina está asociada a un incremento en los niveles hipotalámicos de ARNm de AgRP, NPY, y MCH y a una reducción del ARNm de POMC,  $\alpha$ -MSH y CART (Stephens y cols., 1995; Ollmann y cols., 1997; Qu y cols., 1996; Thornton, 1997; Kristensen y cols., 1998; Shutter y cols., 1997; Beck, 2000; Tian y cols., 2004). Estas alteraciones contribuyen a la ganancia de peso patológica (Fig. 1).

Además de las alteraciones en el sistema endocrino, se han observado cambios en el sistema inmune relacionados con la pérdida de la homeostasis energética durante la obesidad. En estudios previos se ha puesto en evidencia que la obesidad es una

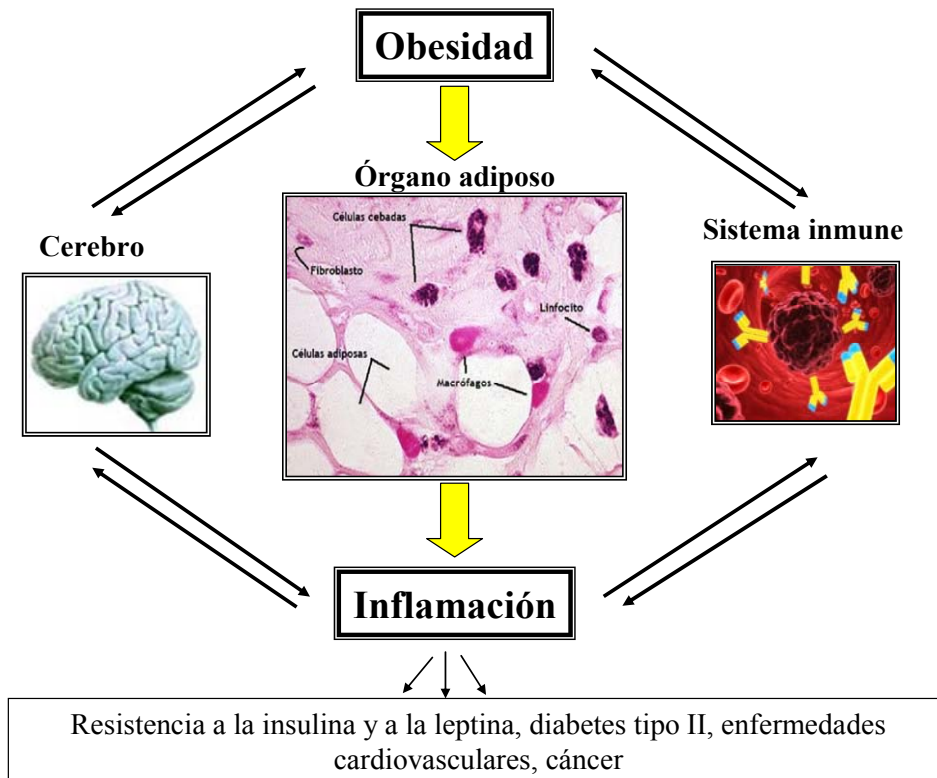
enfermedad que puede ser considerada como un estado patológico de inflamación crónico, en donde se ven alterados los niveles de interleuquinas y adipocinas/citoquinas en el tejido adiposo y en la circulación sistémica (Spiegelman y Hotamisligil, 1993; Kim, 2006). A este bajo grado de inflamación desencadenada metabólicamente se la ha llamado “metainflamación” y se piensa que es originado por un exceso de nutrientes y la alteración de las rutas metabólicas sensibles a la energía (Lehrke y Lazar, 2004; Hotamisligil, 2006) (Fig. 1).



**Fig. 1.** La pérdida del equilibrio homeostático energético en la obesidad. A pesar de un aumento en los niveles de leptina, la aparición de la resistencia a leptina a nivel central provoca un desequilibrio en la producción de neuropéptidos involucrados en el control del peso corporal. Además la leptina podría regular directamente la función inmune a nivel periférico y central.

En distintos modelos animales de obesidad inducida por la dieta, así como en los humanos obesos, las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y el TNF $\alpha$  (Greenberg y Obin, 2006; Shoelson y cols., 2006) y los niveles de leptina se encuentran incrementados en la circulación y tejidos metabólicamente activos como el hígado y tejido adiposo (Zhang y cols., 1994; Frederich y cols., 1995; West y York, 1998). En la obesidad, este estado inflamatorio ha sido relacionado con la aparición de diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Flegal y cols., 2007).

La obesidad inducida por la dieta también causa inflamación a nivel de SNC, a la que se ha involucrado con la alteración de la actividad hipotalámica y la resistencia a la leptina y a la insulina (De Souza y cols., 2005; Posey y cols., 2009; Velloso y cols., 2008; Zhang y cols., 2008) (Figs. 1 y 2).



**Fig. 2.** Esquema que representa la interacción entre el sistema inmune, el cerebro y el órgano adiposo durante la obesidad. La producción de citoquinas en el tejido adiposo se incrementa con la obesidad, provocando un estado de metainflamación, que altera al sistema inmune, al SNC y que puede desencadenar enfermedades relacionadas con la obesidad.

A continuación repasamos los diferentes mecanismos por los cuales las señales inflamatorias periféricas llegan al cerebro, deteniéndonos en el papel fisiológico que las citoquinas desempeñan en el SNC. Seguidamente, presentamos las diferentes acciones de 3 moduladores endocrinos e inmunes: la leptina, la IL-6 y el estradiol, claves en la interacción entre el sistema inmune y el sistema endocrino, deteniéndonos en la estructura y la regulación de sus receptores, y los efectos de los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) como agonistas del estradiol en el SNC. Finalmente, describimos la función de las células de microglía en el SNC y las posibles causas de su activación en circunstancias normales y patológicas.



## **1. La comunicación entre el sistema inmune periférico y el cerebro**

La forma en que la información del sistema inmune periférico llega al cerebro, es llevada a cabo por dos vías diferentes: la humoral y la neural. En la forma humoral, las citoquinas alcanzan el cerebro atravesando la barrera hematoencefálica (BBB) por transporte activo (Banks y cols., 1991), o por difusión a través de los órganos circunventriculares (CVOs) sin BBB (Vitkovic y cols., 2000), por los vasos sanguíneos o los plexos coroideos (Schiltz y Sawchenko, 2002; Konsman y cols., 2004). Se consideran CVOs al órgano vascular de la lámina terminalis (OVLT), la eminencia media (EM), el órgano subfornical (SFO), y el área postrema (AP). Estas son áreas fenestradas por capilares que permiten el paso del plasma (Blatteis, 1992) y que están estratégicamente emplazados para detectar moléculas proinflamatorias sistémicas y para monitorizar cambios osmóticos, iónicos y en la composición hormonal de la sangre (McKinley y cols., 2003). Además, las uniones estrechas, presentes normalmente entre las células endoteliales, se ven alteradas parcialmente en la superficie ventricular y en el límite entre los CVOs y las estructuras adyacentes, explicando la difusión de moléculas de gran tamaño en la región perivascular (McKinley and Oldfield, 1998). A partir de los vasos sanguíneos cerebrales también se puede producir la liberación de otros mensajeros secundarios tales como prostaglandinas (Ericsson y cols., 1997) (Fig. 3.1).

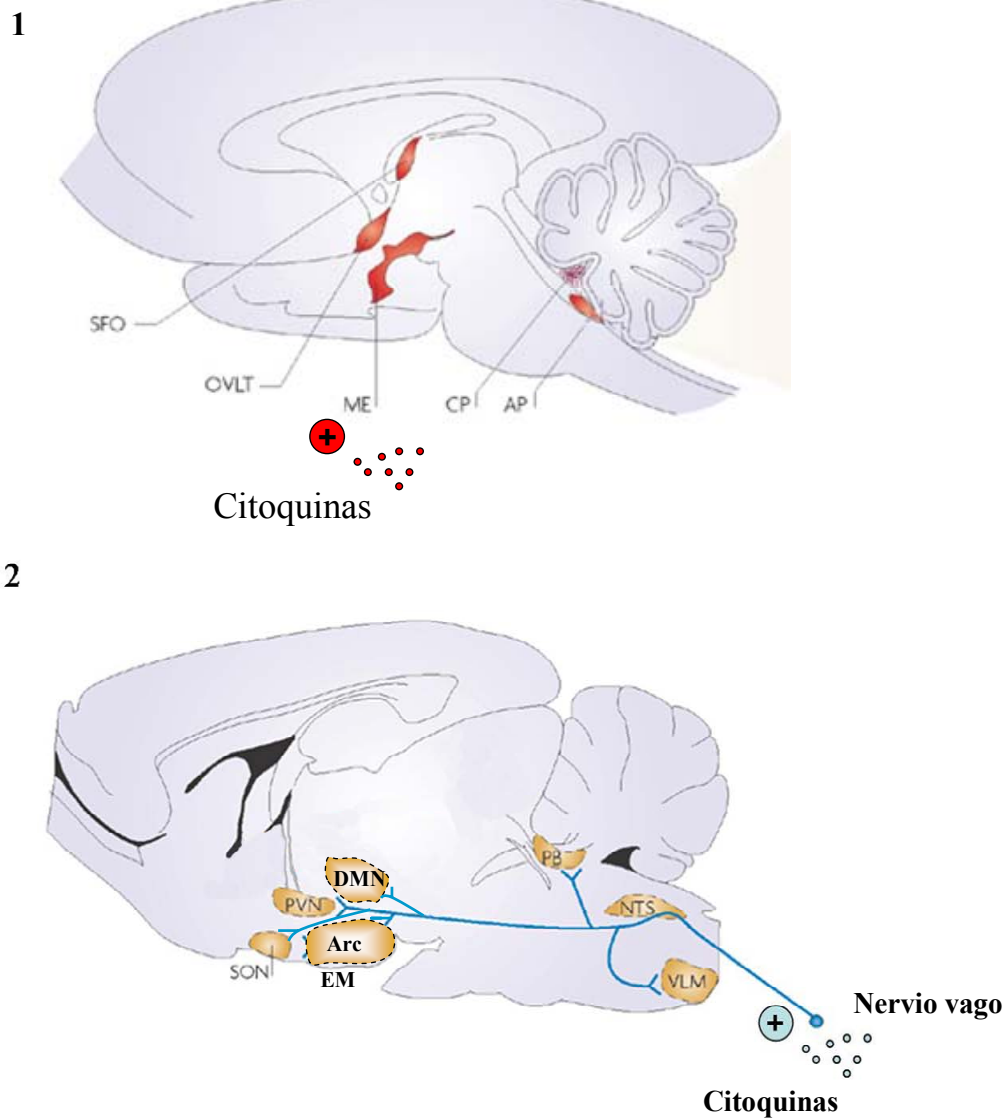
En la vía neural de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, las moléculas proinflamatorias periféricas activan a los nervios aferentes primarios, como el nervio trigémino durante infecciones oro-linguales (Romeo y cols., 2001) y el nervio vago, durante infecciones viscerales y abdominales (Goehler y cols., 1997, 1999, 2000; Ek y cols., 1998; Mascarucci y cols., 1998; Hosoi y cols., 2000). Los estímulos inmunológicos activan las aferencias vagales a través de las citoquinas liberadas por las células dendríticas, macrófagos y otras células inmunológicas asociadas al nervio vago, o indirectamente, a través de las células quimiorreceptoras asociadas al paraganglio vagal, que detectan los componentes que circulan por la sangre o la linfa (Goehler y cols., 1999; 2000). Esto desencadena la activación de neuronas en el complejo dorsal vagal (DVC) del bulbo raquídeo, que está constituido por el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo motor dorsal del vago (DMNV) y el área postrema (AP) (Berthoud y Neuhuber, 2000; Konsman y cols., 2000). El DMV es un integrador autonómico

rombencefálico de la regulación de la ingesta (Grill y Kaplan, 2002). El NTS envía proyecciones entre otras áreas, al núcleo parabraquial (PB), la médula ventrolateral (VLM), a la amígdala, al núcleo supraóptico (SO) y a los núcleos hipotalámicos: PVN, dorsomedial (DMN) y Arc, involucrados en la regulación del comportamiento en la alimentación (Ricardo y Koh, 1978; Swanson y Sawchenko, 1980). Estos núcleos también reciben fibras eferentes procedentes de distintas áreas hipotalámicas involucradas en la regulación metabólica y de las funciones autonómicas, como el LHA (Jiang y cols., 2003), DMN y Arc, y la amígdala (Gray y cols., 1986). En diversos estudios se ha observado que la leptina, la ghrelina y el NPY podrían ejercer un efecto modulador de la ingesta y de la motilidad gástrica, a nivel del DVC (Gray y cols., 1986; Buyse y cols., 2001; Boghossian y cols., 2006; Wang y cols., 2008; Dallaporta y cols., 2009; Mahaut y cols., 2010) (Fig. 3.2). El cerebelo también desempeña un papel relevante en la integración somática-visceral del control de la ingesta y la motivación por el alimento, a través de conexiones recíprocas entre el cerebelo y el hipotálamo (Zhu y cols., 2008).

El hipotálamo por lo tanto, no sólo integra las señales de información para ajustar el metabolismo y comportamiento, sino que también influye en la respuesta inmune. En especial, el núcleo Arc parece tener un papel muy relevante en esta integración, ya que es capaz de controlar el proceso antiinflamatorio, mediante la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y la división simpática del sistema nervioso autonómico. El Arc proyecta al PVN, que libera la CRH en el plexo portal de la EM, induciendo la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) por la hipófisis anterior, que estimula las glándulas adrenales que liberan glucocorticoides los cuales, por su acción antiinflamatoria e inmunosupresora, impiden una respuesta inmune exacerbada (Munck y cols., 1984; Auphan y cols., 1995; Scheinman y cols., 1995).

Además el cerebro, vía el nervio vago, puede controlar la inflamación sistémica (Borovikova y cols., 2000; Wang y cols., 2003; Ulloa, 2005). Así, se ha descrito que mediante la liberación de acetilcolina (ACh) el nervio vago puede controlar la inflamación sistémica inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) en cultivos de macrófagos y macrófagos intraperitoneales de roedores. Esta acción se ejerce a través de los receptores nicotínicos de los macrófagos, reduciendo la síntesis de TNF $\alpha$ , IL-1,

IL-6 y la interleuquina 18 (IL-18) (Borovikova y cols., 2000; Wang y cols., 2003; Ulloa, 2005).



**Fig. 3. Comunicación entre el sistema inmune periférico y el cerebro, por 2 vías diferentes. 1. La vía humoral: las citoquinas periféricas acceden al cerebro, por los CVOs, los vasos sanguíneos y los plexos coroideos. 2. La vía neural: las citoquinas periféricas activan el nervio vago, que proyecta a diferentes núcleos cerebrales implicados en el control de la ingesta y el comportamiento alimentario. AP: área postrema; Arc: núcleo arcuato; DMN: núcleo dorsomedial; EM: eminencia media; NTS: núcleo del tracto solitario; OVLT: órgano vascular de la lámina terminalis; PB: núcleo parabraquial; PVN: núcleo paraventricular; SFO: órgano subfornical; SON: núcleo supraóptico; VLM: médula ventrolateral. (Esquema adaptado de Dantzer y cols., 2008).**

## **2. Funciones de las citoquinas en el SNC**

Se ha comprobado que a largo plazo, la alimentación basada en una dieta rica en grasas puede modular la expresión de más del 10% de genes que se expresan en el hipotálamo de roedores (De Souza y cols., 2008; De Giorgio y cols., 2009). El análisis de estos genes ha revelado que algunos de ellos están relacionados con la función inmunológica (De Souza y cols., 2008). Por ejemplo, la IL-1, la IL-6 y el TNF $\alpha$ , se encuentran significativamente incrementadas en el hipotálamo de las ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (De Souza y cols., 2005, 2008). Posteriormente, Milanski y cols. (2009), observaron que el consumo de una dieta rica en grasas, además de incrementar la expresión de estas citoquinas proinflamatorias, produce un aumento en la expresión de F4/80, un marcador de macrófagos maduros y microglía (Austyn y Gordon, 1981), en las células de la EM y del Arc del hipotálamo. Esto sugiere que la respuesta inmune innata está implicada en la respuesta inflamatoria generada por la dieta rica en grasas.

La IL-1, la IL-6 y el TNF $\alpha$ , son mediadores comunes entre el sistema neuroendocrino e inmune que están involucrados en la activación de los circuitos neuronales que restauran el equilibrio homeostático y en la modulación de la inflamación a través del eje HPA (Turnbull y Rivier, 1999; Haddad y cols., 2002). La IL-1 es un pirógeno endógeno que actúa en el endotelio de los vasos sanguíneos del cerebro para activar la liberación de moléculas intermedias, tales como las prostaglandinas. De hecho, la microvasculatura cerebral, muestra una expresión constitutiva del transcrito del receptor de la IL-1 tipo 1 (IL-1R1) (Ericsson y cols., 1995). Las prostaglandinas desempeñan una función importante en la cascada de señales extracelulares que median los efectos de citoquinas circulatorias en el sistema nervioso (Rivest y cols., 2000). El factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina producida también por la microglía en estado activado, que ejerce su acción en las neuronas hipotalámicas secretoras de CRH (Bernardini y cols., 1990). Al igual que la IL-1 y la IL-6, la administración central y sistémica de TNF- $\alpha$  estimula la liberación de CRH y al eje HPA (Sharp y cols., 1989). Tanto la IL-1 $\beta$  (von Meyenburg y cols., 2003) como el TNF- $\alpha$  (Smith y Kluger, 1993; Opara y cols., 1995; Chance y cols., 2003) y la IL-6 (Stenlöf y cols., 2003) parecen jugar un importante papel en la inducción de la respuesta anorexigénica. Estas citoquinas periféricas son capaces de atravesar la BBB y

activar las neuronas del PVN del hipotálamo, que controlan el HPA mediante la secreción de ACTH en respuesta a la inflamación e inducir la liberación de glucocorticoides (Fukata y cols., 1989, Lyson y cols., 1991). La regulación de las citoquinas está mediada por un mecanismo de retroalimentación negativo generado por su propia actividad proinflamatoria periférica, y por los glucocorticoides endógenos, que contrarrestan los efectos de las citoquinas.

Las quimioquinas, una familia de proteínas de pequeño peso molecular (8-12 kDa) que se encuentran en el cerebro y la periferia y que están involucradas en la migración celular y la comunicación intercelular, también juegan un importante papel en situaciones en las que se produce una pérdida del control homeostático. Estas citoquinas y sus receptores acoplados a proteínas G, están localizados en neuronas y microglía en diversas áreas cerebrales tales como el hipotálamo, el núcleo accumbens, el sistema límbico, el hipocampo, el tálamo, la corteza, los bulbos olfatorios y el cerebelo (Horuk y cols., 1997).

### **3. Moduladores neuroendocrinos e inmunes**

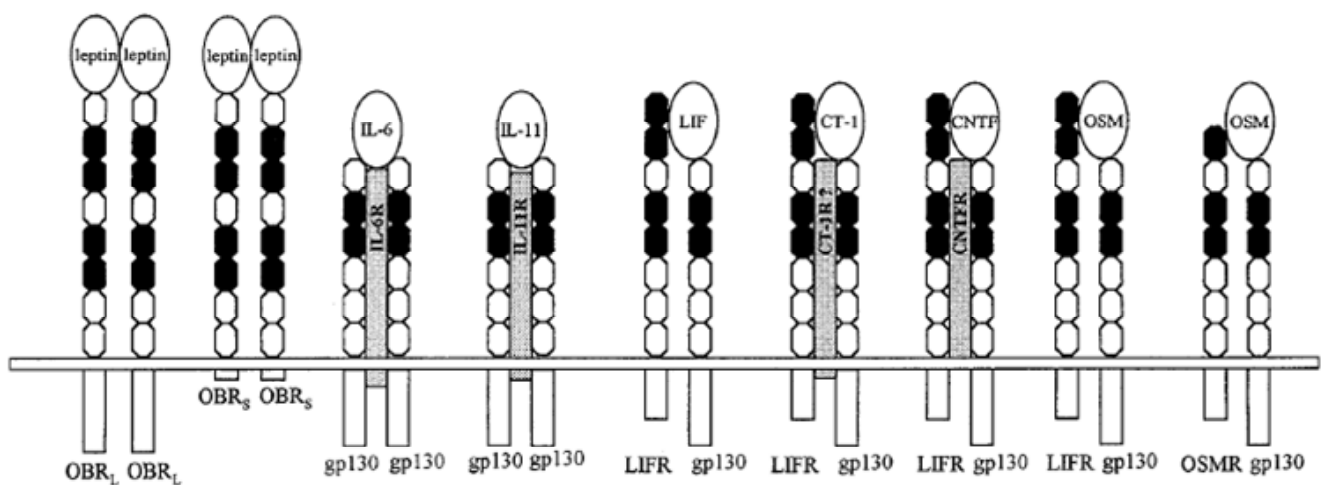
#### **3.1 La leptina**

- **La fisiología de la leptina y su receptor**

El término leptina deriva de la palabra griega *leptos*, que significa "delgado". Esta hormona fue descubierta en 1994 por Jeffrey M. Friedman y colaboradores, en la Universidad Rockefeller, mediante el estudio de ratones obesos e hiperfágicos, mutantes para el gen *ob* (ratones *ob/ob*). La mutación del gen *ob* en estos ratones provoca la carencia de leptina sérica, la cual está ligada a infertilidad, obesidad y diabetes (Zhang y cols., 1994). La leptina fue la primera hormona identificada entre las liberadas por los adipocitos. La cantidad de leptina producida es directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo (Zhang y cols., 1994). Esta adipoquina no sólo informa al cerebro sobre el nivel de almacén energético, sino que también está involucrada en el control del metabolismo energético en la periferia, de la reproducción, del metabolismo óseo y de la inmunidad (Fantuzzi y Fanggioni, 2000).

La estructura proteica de la leptina consta de un conjunto de 4 hélices que la hace similar a la superfamilia de citoquinas de 4 hélices agrupadas de cadena larga

(Zhang y cols., 1997) y posee una similitud estructural con la IL-6, las interleuquinas 12 (IL-12) y 15 (IL-15), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), oncostatina M (OSM), prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH). Además el receptor de leptina (ObR), es un miembro de la familia de receptores de citoquinas de clase I y su estructura primaria muestra homologías con las subunidades de señalización de los receptores tipo IL-6 que incluyen gp130, como el receptor de la IL-6, IL-11, IL12, del factor inhibidor de leucemia (LIFR), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), de la cardiotropina 1 (CT-1), G-CSF (G-CSFR), OSM y de PRL (Tartaglia y cols., 1995; Baumann y cols., 1996) (Fig. 4).



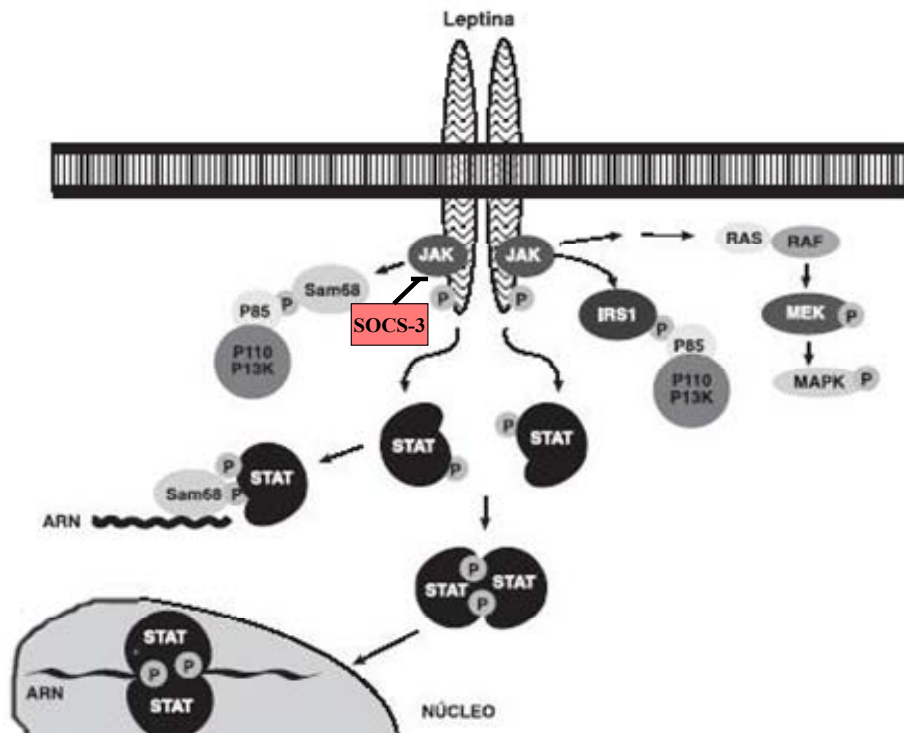
**Fig. 4. Similitudes estructurales entre el receptor de la leptina, ObR, y los receptores de citoquinas de clase I. Una molécula de leptina se une a cada ObR, formando un complejo tetramérico de dos receptores y dos moléculas de leptina necesarios para la señalización. Las figuras negras representan los dominios conservados de la familia de receptores de citoquinas de clase I. CNTF: factor neurotrófico ciliar CT-1: cardiotropina 1; Leptin: leptina; IL-6, IL-11: interleuquinas 6 y 11; LIF: factor inhibidor de leucemia; LIFR: receptor del factor inhibidor de leucemia; ObR<sub>L</sub>: isoforma larga del receptor de leptina; ObR<sub>S</sub>: isoforma corta del receptor de leptina; OSM: oncostatina; OSMR: receptor de oncostatina. (Esquema extraído del trabajo de Fantuzzi y Faggioni, 2000).**

Existen al menos 6 formas de corte y empalme alternativas con dominios citoplasmáticos de diferentes longitudes, conocidas como ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe y ObRf (Tartaglia y cols., 1995, 1997). Estos receptores son glicoproteínas de membrana con dominios de fibronectina tipo III en la región extracelular y con un módulo de 200 aminoácidos compartidos que contienen 4 residuos conservados de cisteína y 2 motivos del tipo citoquina de unión a la membrana proximal, Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (Tartaglia y cols., 1995, 1997). El ObRa es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos y células, incluyendo riñón, hígado, pulmón y bazo (Tartaglia y

cols., 1995). Las isoformas cortas del receptor en general, parecen mediar el transporte intracelular y la degradación de la leptina en el interior de los lisosomas (Barr y cols., 1999).

La leptina sistémica circula en la forma libre o unida al ObRe (Sinha y cols., 1996). Aunque la función de ObRe no está bien caracterizada, podría actuar de forma similar al receptor de IL-6 soluble (IL-6Rs) como una proteína transportadora (Peters y cols., 1998) o como un inhibidor de la actividad de la leptina (Tu y cols., 2008), similar a los receptores solubles de la IL-1 o el TNF $\alpha$  (Arend y cols., 1994; Edwards, 1999).

La forma larga del ObR, denominada ObRb, tiene una actividad de señalización similar a la de los receptores de citoquinas del tipo de la IL-6 (Baumann y cols., 1996; Vaisse y cols., 1996). La unión de la leptina a su receptor activa a la tirosina quinasa intracelular tipo 2 de la familia de las *Janus* quinasas (JAK-2) que se autofosforila y activa a los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), incluyendo STAT-1, 3, 5 y 6 en diversos tipos celulares, como monocitos y macrófagos (Cui y cols., 2006; Mansour y cols., 2006). STAT-3 regula la activación de proteínas supresoras de la señalización de citoquinas de tipo 3 (SOCS-3), involucradas en el mecanismo inhibitorio de la señalización de la leptina (Bjørbaek y cols., 1998). Además de SOCS-3, la proteína fosfatasa 1B (PTP-1B) también participa en la regulación inhibitoria de la señalización de la leptina, defosforilando a la JAK-2 (Kasubaska y cols., 2002; Zabolotny y cols., 2002). La JAK-2 fosforilada también activa otras vías como la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que a su vez fosforila a la serina/treonina quinasa Akt (Martin-Romero y Sánchez-Margalet, 2001). La ruta PI3K/Akt representa el comienzo de una cascada de señalización que media los efectos de varias citoquinas proinflamatorias. El receptor de leptina, a través de la JAK-2, puede fosforilar a las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS) e iniciar la vía de señalización IRS-PI3K/Akt (Szanto y Khan, 2000; Niswender y cols., 2001) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Esquema de la señalización del receptor de leptina en células del sistema inmune descrito arriba. La formación del complejo tetramérico leptina/ObR inicia la señal de transducción por activación de la JAK quinasa que activa a los miembros de la familia STAT. La proteína JAK también activa a las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt. SOCS-3 inhibe la señalización de la leptina, defosforilando a JAK. ERK: proteína quinasa activada por señales extracelulares; JAK: tirosina quinasa intracelular de la familia de las Janus quinasas; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; PI3K: quinasa fosfatidilinositol 3; STAT: transductores de señal y activadores de la transcripción. SOCS-3: proteínas supresoras de la señalización de citoquinas de tipo 3. (Esquema extraído del trabajo realizado por Sánchez-Margalet y cols., 2006).

El ObRb se expresa en el hipotálamo, en áreas responsables de la secreción de neuropéptidos y neurotransmisores que regulan el apetito, el peso corporal (Tartaglia y cols., 1995, 1997) y la masa ósea (Ducy y cols., 2000). El ObRb también se expresa en las células endoteliales, en las  $\beta$ -pancreáticas, en el ovario, en los precursores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> de la médula ósea, en los monocitos/macrófagos, y en las células T y B (Tartaglia y cols., 1995, 1997; Friedman y Halaas, 1998; Sierra-Honigmann y cols., 1998; Sánchez-Margalet y cols., 2003).

En el hipotálamo de humanos y roedores, se ha detectado el ARNm del ObRb en el Arc, DMN, VMN y núcleo premamilar ventral, y una expresión moderada en el área periventricular (Pe), LHA y PVN (Mercer y cols., 1996; Fei y cols., 1997; Elmquist y cols., 1998). En otras áreas cerebrales, encontramos niveles altos del ARNm de ObRb



en el hipocampo, tálamo, y las células de la capa granular y neuronas de Purkinje del cerebelo (Guan y cols., 1997; Elmquist y cols., 1998; Mercer y cols., 1998).

### • El papel de la leptina en la regulación metabólica

Uno de los mecanismos propuestos de homeostasis energética es que la grasa corporal es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo de adiposidad, en el que está involucrada la leptina (Schwartz y cols., 2000). Los niveles de leptina se correlacionan con la adiposidad, disminuyendo acusadamente con la restricción calórica, e incrementándose con la sobrealimentación (MacDougald y cols., 1995; Trayhurn y cols., 1995; Ahima y cols., 1996; Das, 2001). La leptina es transportada al cerebro a través de la BBB por un sistema de transporte saturable mediado por el ObRa, que está expresada prominentemente en los plexos coroideos (Tartaglia y cols., 1995; Banks y cols., 1996; Golden y cols., 1997), y actúa en núcleos específicos del control de la ingesta como el Arc, para inducir la reducción de la ingesta e incrementar el gasto energético (Baskin y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000).

La acción anoréxica de la leptina está mediada por la activación de las neuronas hipotalámicas POMC/CART en el Arc, que incrementan la producción de  $\alpha$ -MSH, para inhibir la ingesta, y de PACAP en el VMN. La leptina simultáneamente, suprime la actividad de las neuronas NPY/AgRP del Arc, contribuyendo así a disminuir la ingesta (Elias y cols., 1999; Ahima and Flier, 2000; Beck y cols., 2000; Korner y cols., 2001; Horvath, 2005; Segal y cols., 2005; Kurrasch y cols., 2007; Santos, 2009).

Con el envejecimiento, los niveles de leptina decrecen; este hecho parece ser independiente del índice de masa corporal (Isidori y cols., 2000). La secreción de leptina también parece estar regulada por factores hormonales diferentes, que incluyen glucocorticoides (De Vos y cols., 1995), insulina (Saladin y cols., 1995), y esteroides sexuales (Brann y cols., 1999; Machinal y cols., 1999).

### • La acción de la leptina en la inmunidad

La leptina puede actuar como un inductor de la fase aguda temprana de la inmunidad, tal y como lo hacen la IL-1 y la IL-6, ya que se produce un incremento de sus niveles durante la inflamación, y es capaz de modular la respuesta inmune innata y adaptativa (Loffreda y cols., 1998; Sánchez-Margalet y cols., 2003). La leptina es capaz de modular el sistema inmune, induciendo la activación de los monocitos/macrófagos, los neutrófilos y la producción de mediadores proinflamatorios como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 (respuesta inmune innata), (Grunfeld y cols., 1996; Sarraf y cols., 1997; Santos-Álvarez y cols., 1999; Fantuzzi y cols., 2000; Bullo y cols., 2003; La Cava y Matarese, 2004), la maduración y supervivencia de linfocitos T y precursores hematopoyéticos y la activación de linfocitos T auxiliares (respuesta inmune adaptativa) (Lord y cols., 1998; Sánchez-Margalet y cols., 2003). En algunos trabajos se ha asociado la deficiencia de leptina con una respuesta inmune debilitada y un incremento de la susceptibilidad a infecciones (Busso y cols., 2002; Mancuso y cols., 2002; Moore y cols., 2003; Matarese y cols., 2002). No obstante, en otros estudios realizados en humanos con endotoxemia experimental aguda, sepsis en recién nacidos o infección con el VIH, no se ha encontrado incrementada la leptina circulante (Bornstein y cols., 1998; Koç y cols., 2003; Yarasheski, y cols., 1997). Así pues, la leptina podría actuar como inductor de la fase aguda de la inmunidad en determinadas condiciones.

Las células microgliales, son conocidas como los macrófagos del SNC, y se ha demostrado que la leptina puede estimular a la microglía *in vitro*, a través de los receptores de leptina ObRa y ObRb, induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias relacionadas con el control de la ingesta, como la IL-6 (Tang y cols., 2007) y la IL-1 $\beta$  (Pinteaux y cols., 2007) y también potenciado un fenotipo microglial más reactivo ante un estímulo inflamatorio como el LPS (Lafrance y cols., 2010).

### • La leptina y el sistema reproductor

La leptina desempeña una función importante en la iniciación de la pubertad y en el mantenimiento de la función reproductiva (Gueorguiev y cols., 2001). Tanto en humanos como en roedores (Mann y Plant, 2002), está implicada en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo y la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en la hipófisis

anterior (Yu y cols., 1997). La administración de leptina a ratas prepuberales acelera el comienzo de la función reproductiva (Chehab y cols., 1997) y en pacientes deficientes en leptina, la administración de la hormona restaura la liberación de la GnRH, la LH y el desarrollo puberal (Farooqi y cols., 1999). La leptina actúa en el hipotálamo de la rata estimulando la secreción de GnRH *in vivo* (Watanobe, 2002), modulando indirectamente la liberación de GnRH a través de la reducción de expresión de NPY y CART, en el Arc (Plant y Shahab, 2002; Lebrethon y cols., 2000). El efecto de la leptina en la secreción de GnRH también podría estar mediado a través de las neuronas productoras de kisspeptina (Smith y cols., 2006).

La leptina también tiene efectos directos en las gónadas. En los testículos, es capaz de modular la proliferación, la diferenciación de células germinales y la esteroidogénesis por mecanismos autocrinos y paracrinos (Tena-Sempere y cols., 1999, 2001; Fombonne y cols., 2007; Herrid y cols., 2008). La leptina también modula la producción de esteroides en el ovario de la oveja (Kendall y cols., 2004). La obesidad causada por una deficiencia genética de la señalización de la leptina, puede cursar con hipogonadismo hipogonadotrófico, ya que se apagan los ciclos de GnRH y LH (Caprio y cols., 2001). Además, en esta clase de hipogonadismo se ha observado que existe una deficiencia de la actividad aromatasa en humanos (Simpson, 1998; Bulun, 2000).

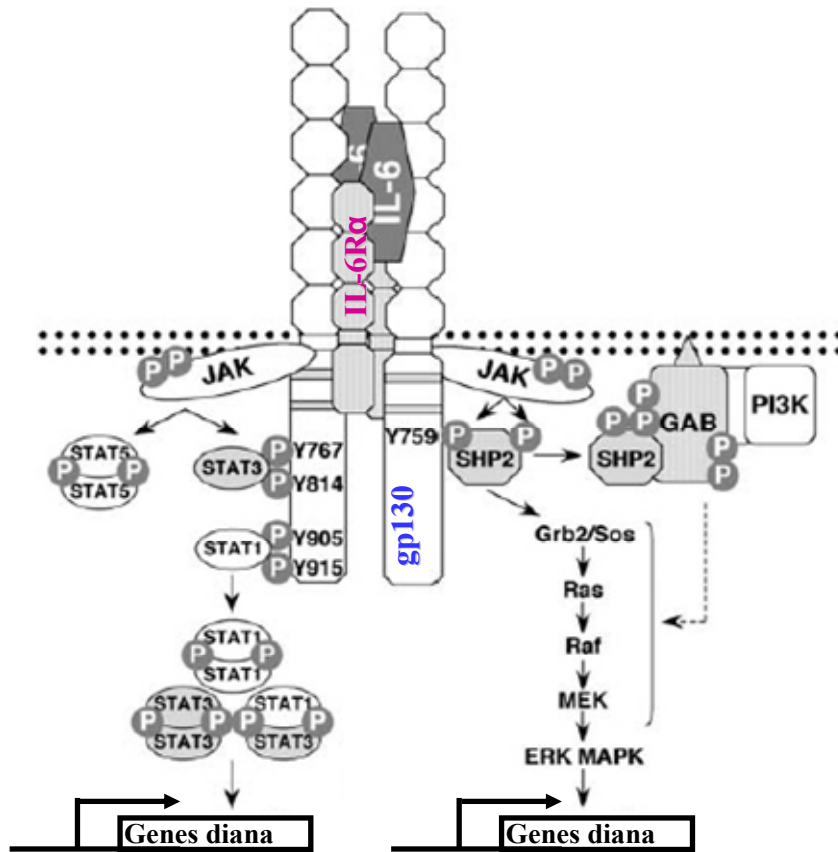
## **3.2 La IL-6**

### **• La fisiología de la IL-6 y su receptor**

La IL-6 es funcionalmente y estructuralmente similar a otras citoquinas tales como LIF, CNTF, OSM, CT-1 y la IL-11. Se ha agrupado a estas citoquinas en la denominada familia de citoquinas IL-6 o de gp130 (Grotzinger y cols. 1997). Todas ellas comparten la proteína gp130 como uno de los componentes de su receptor, que fue descubierto por Taga y cols., en 1989. Además están englobadas en la familia de citoquinas de receptor tipo 1. Las características principales de los receptores de esta familia son 4 residuos de cisteína bien conservados en el extremo N terminal de las moléculas y un motivo localizado en el dominio transmembrana, y en el dominio extracelular encontramos 2 moléculas repetidas de fibronectina III (Kishimoto y cols., 1995).

Los efectos centrales y periféricos de la IL-6 están mediados a través del receptor de la IL-6 (IL-6R) (Yamasaki y cols., 1998). El IL-6R es un heterodímero que consiste en 2 glicoproteínas de membrana: una de 80 kDa (IL-6R $\alpha$  ó gp80) y otra de 130 kDa que es la que transduce la señal de la IL-6 (IL-6 ST, IL-6R $\beta$ , ó gp130). La IL-6 al unirse a su receptor causa una asociación con 2 moléculas de gp130, y señala una cascada de acontecimientos intracelulares (Darnell y cols., 1994; Hirano y cols., 1997; Ihle y cols., 1995; Kishimoto, 1994). Se produce la activación de tirosina quinasas intracelulares de la familia de las JAKs, éstas fosforilan a los factores de transcripción de la familia STAT, translocándose al núcleo para unirse a elementos de respuesta a IL-6 específicos, y de este modo regular los genes específicos de IL-6. Una segunda ruta en la que suele estar involucrada la proteína G Ras, conduce a la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que fosforilan a otro conjunto de factores de transcripción en los residuos de serina o treonina (Fig. 6).

Debido al uso común de la señal de transducción gp130, las funciones biológicas de la familia de citoquinas IL-6 se solapan ampliamente, es el caso de la inducción de la producción de proteínas de fase aguda en el hígado (APPs) (Heinrich y cols., 1990; Baumann y Gauldie, 1994; Moshage, 1997). A semejanza de la IL-6, la IL-11, CNTF, CT-1, LIF y OSM, se unen a un receptor específico de su ligando, aunque hay estudios que demuestran que el CNTF, LIF, OSM, IL-11 y la CT-1, también son capaces de regular al IL-6R $\alpha$  (Baumann y cols., 1996; Taga y Kishimoto, 1997). Se ha descrito que la OSM humana puede unirse al complejo formado por gp130/LIFR o a gp130/OSMR, sin embargo en ratón se une exclusivamente al complejo gp130/OSMR (Ichihara y cols. 1997), lo que contribuye a la complejidad de la regulación del receptor de la familia de citoquinas IL-6.



**Fig. 6.** Las vías de señalización intracelular generadas a través de gp130. En esta figura se muestran las rutas de transducción generadas por la IL-6. La formación del complejo hexamérico IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130 inicia la señal de transducción por activación de JAK quinasas. Las enzimas SHP-2 y STAT reconocen los residuos fosforilados en tirosina (P) de gp130, dando lugar a las dos vías de señalización principales de gp130: la cascada derivada de SHP-2/ERK MAPK (derecha) y la vía mediada por STAT (izquierda). ERK: proteína quinasa activada por señales extracelulares; JAK: tirosina quinasa intracelular de la familia de las Janus quinasas; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; SHP-2: proteína tirosina fosfatasa con dominios de homología 2 de Src; STAT: proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción. (Figura adaptada de Kamimura y cols., 2003).

La actividad de la IL-6 puede estar regulada por el número de receptores funcionales más que por alteraciones en la biosíntesis de la IL-6. Las alteraciones en el número de IL-6Rs funcionales se producen a causa de que el complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  se internaliza rápidamente tras la activación en membrana de la proteína gp130 (Nesbitt y Fuller 1992; Dittrich y cols., 1994) y es degradado, su vida media en diferentes tipos celulares es de 2-3 h (Rose-John y Heinrich, 1994). La capacidad de modulación del IL-6R puede cambiar bajo diferentes condiciones.

El IL-6R $\alpha$  también existe en una forma soluble en el suero (IL-6Rs), y es producido por una escisión proteolítica de la proteína o por corte y empalme alternativo

del transcrito del IL-6R $\alpha$  (Peters y cols., 1998). El complejo IL-6/IL-6Rs puede potenciar los efectos de la IL-6 y podría también servir para activar a las células que no expresan el receptor de membrana, desencadenando el proceso de trans-señalización (Rose-John y Heinrich, 1994; Schöbitz y cols., 1995).

### • Funciones fisiológicas de la IL-6

La IL-6 es una citoquina multifuncional, sintetizada por una gran variedad de células e inducible bajo diferentes estímulos. La IL-6 actúa en un amplio espectro de células diana y es producida por varias estirpes celulares, como monocitos/macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, astrocitos, microglía y neuronas (Schöbitz y cols., 1992, 1993; Nakajima y Kohsaka, 2001; Vollenweider y cols., 2003; Krueger y cols., 1991). Se ha demostrado que está involucrada en la inducción de la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B y en su maduración (Muraguchi y cols., 1988), en el crecimiento celular de los linfocitos T y en su diferenciación a linfocitos T citotóxicos (Rincon y cols., 1997; Diehl y cols., 2002), en la estimulación de la formación de colonias de células madre hematopoyéticas (Schirmacher y cols., 1998), y en la regulación de las proteínas de fase aguda en el hígado (Heinrich y cols., 1990; Baumann y Gauldie, 1994; Moshage, 1997). Muchos tumores, incluyendo el sarcoma de Kaposi (Miles y cols., 1990), el melanoma (Molnar y cols., 2000), el mieloma múltiple (Kawano y cols., 1988; Frassanito y cols., 2001), y el cáncer de próstata (Smith y cols., 2001; Ueda y cols., 2002) producen IL-6, que actúa como un factor de crecimiento autocrino o paracrino para el neoplasma.

La IL-6 juega un importante papel en pacientes con artritis reumatoide (Rifas 1999), en el desarrollo de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (Jilka y cols. 1992; Girasole y cols., 1992; Passeri y cols., 1993) donde los niveles de la IL-6 en osteoblastos y células estromales se encuentran elevados, probablemente a causa de la interrupción del control homeostático ejercido por los estrógenos (Ray y cols., 1997). También se ha relacionado a la IL-6 con otras enfermedades humanas, como la esclerosis múltiple, el asma bronquial, la artritis reumatoide, la miastenia gravis, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Kamimura y cols., 2003).

### • La IL6 y el sistema nervioso y endocrino

Cerca de un 30% de la IL-6 circulante procede del tejido adiposo (Mohamed-Ali y cols., 1997; Orban y cols., 1999). En la obesidad en humanos, el tejido adiposo visceral aumenta la producción de IL-6 provocando un incremento en sus niveles circulantes (Laimer y cols., 2002; Hanusch-Enserer y cols., 2003; Kopp y cols., 2003; Vázquez y cols., 2005). Se ha vinculado a la IL-6 en la regulación del metabolismo de la glucosa, contribuyendo a la resistencia a la insulina, y con el metabolismo lipídico, por lo que sus niveles plasmáticos se han correlacionado con la diabetes tipo 2 y la adiposidad (Bastard y cols., 2002; Kern y cols., 2001; Pradhan y cols., 2001; Kim y cols., 2009).

La IL-6, como la IL-1, tiene capacidad pirogénica. En ratones deficientes de IL-6 se observó que no eran capaces de generar una respuesta febril ante estímulos proinflamatorios como el LPS y la IL-1 $\beta$  (Chai y cols., 1996). La IL-6 ejerce un papel relevante en la regulación de la homeostasis energética, tanto en roedores como en humanos (Wallenius y cols., 2002a, b, 2003; Stenlöf, 2003), por eso ha sido propuesta como uno de los mediadores de la interacción entre el sistema inmune y el sistema endocrino. Se ha observado que es capaz de inducir fiebre, reducir la ingesta y la capacidad locomotora durante un proceso infeccioso (Schöbitz y cols., 1995), siendo necesaria en la estimulación prolongada de la actividad neural durante la endotoxemia (Vallières y Rivest, 1999). Se ha observado además, que la IL-6 producida durante el ejercicio es capaz de actuar como un sensor de demanda energética en el músculo y, posiblemente, participe en las vías de señalización del cerebro implicadas en la homeostasis energética (Pedersen y cols., 2004). Dishman en 1997, observó que durante la actividad física, la IL-6 junto a la señalización de la melanocortina, aumentaba la expresión de CRH en el PVN y posiblemente en el núcleo dorsomedial. La producción de esta citoquina durante el ejercicio aumenta la sensibilidad hipotalámica a la leptina y a la insulina (Cintra y cols., 2007). Además, la IL-6 está implicada en la supervivencia neuronal, crecimiento y diferenciación, metabolismo de neurotransmisores y en la formación de dendritas (Heinrich y cols., 1995; Gadiant y Otten, 1995; Grothe y cols., 2000).

### • La IL-6 y la reproducción

La liberación de determinadas citoquinas proinflamatorias como el  $\text{TNF}\alpha$ , la IL- $1\beta$  o la IL-6, durante una enfermedad, una infección o tras la administración de LPS, puede ejercer un efecto inhibitorio central del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). En ratas tratadas con LPS sistémico en las que se encuentran niveles elevados de  $\text{TNF}\alpha$ , IL- $1\beta$  e IL-6 en el área preóptica media hipotalámica (MPOA), se ha observado que las secreciones de LH y GnRH se encuentran inhibidas (Watanobe y Hayakawa, 2003).

Se han publicado datos contradictorios sobre la implicación de la IL-6 y de las citoquinas de la familia de clase I, como supresores del eje neuroendocrino reproductivo (Dozio y cols., 2009). En un estudio realizado en ratas ovariectomizadas a las que se inyectó  $\text{TNF}\alpha$ , IL- $1\beta$  o IL-6, se observó que se producía una disminución de LH plasmático, aunque la administración periférica de estas citoquinas no tuvo ningún efecto (Rivier y Vale, 1990). A pesar de esta evidencia, en otros estudios no se ha encontrado un efecto claro en el eje neuroendocrino reproductivo (Kalra y cols., 1998; Watanobe y Hayakawa, 2003).

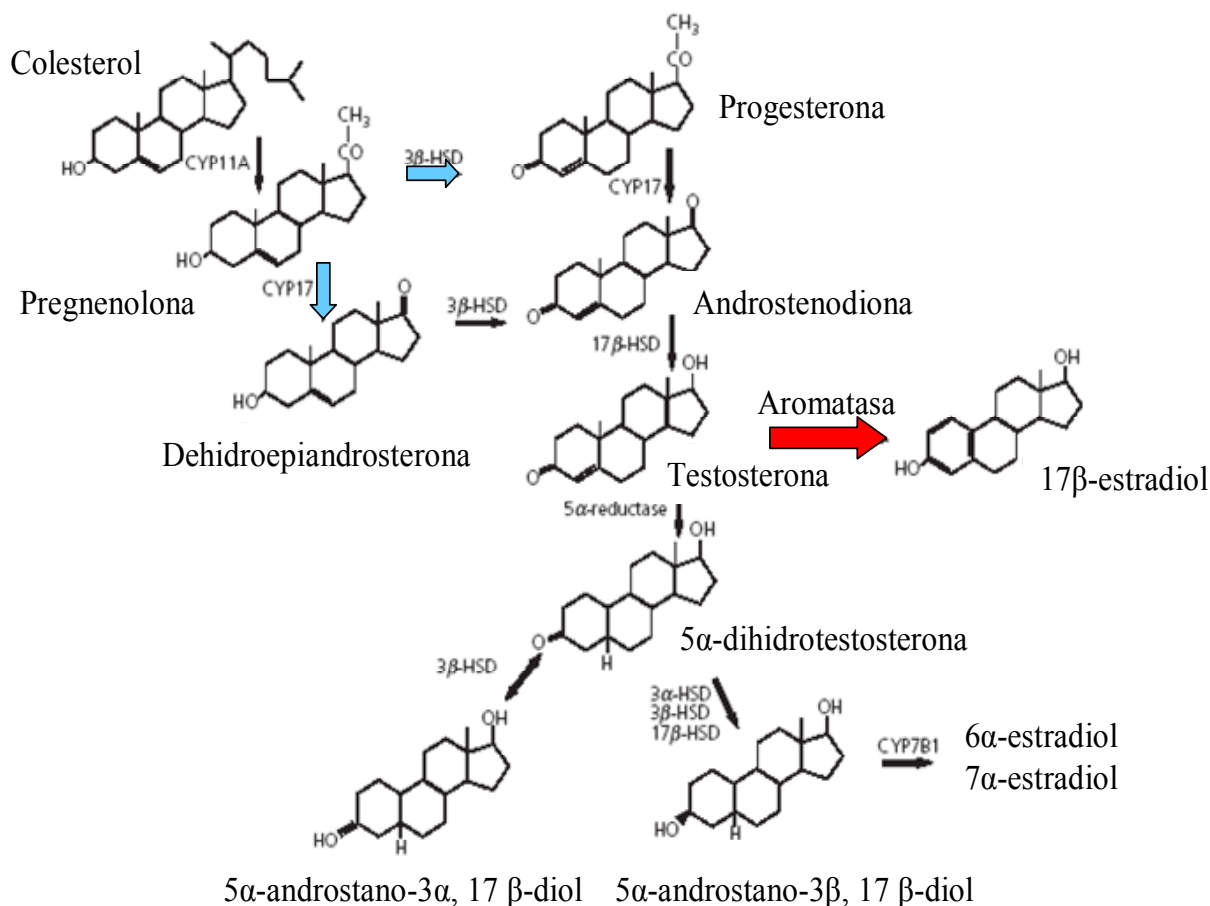
## 3.3 El estradiol

Numerosos estudios han demostrado el papel decisivo de las hormonas sexuales, entre ellas el estradiol, en la diferenciación sexual del cerebro y el desarrollo del comportamiento sexual y reproductivo (MacLusky y Naftolin, 1981; Lephart y Ojeda, 1990; Hutchison, 1991; Hutchison y cols., 1994).

El  $17\beta$ -estradiol, además de ser una hormona gonadal con actividad endocrina, se produce localmente en el sistema nervioso. Se sintetiza a partir del colesterol por una reacción enzimática que implica su conversión a pregnenolona (Jung-Testas y cols., 1989). Esta es la única reacción que sucede en la membrana interna mitocondrial, las siguientes modificaciones hasta la formación del  $17\beta$ -estradiol tienen lugar en el retículo endoplasmático. La síntesis del  $17\beta$ -estradiol requiere varias modificaciones, que implican la formación de esteroides precursores como la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la testosterona (Baulieu y Schumacher, 2000). En la figura 7 se recogen los



procesos de síntesis y metabólicos más destacados de la progesterona, testosterona y del 17β-estradiol en el cerebro.



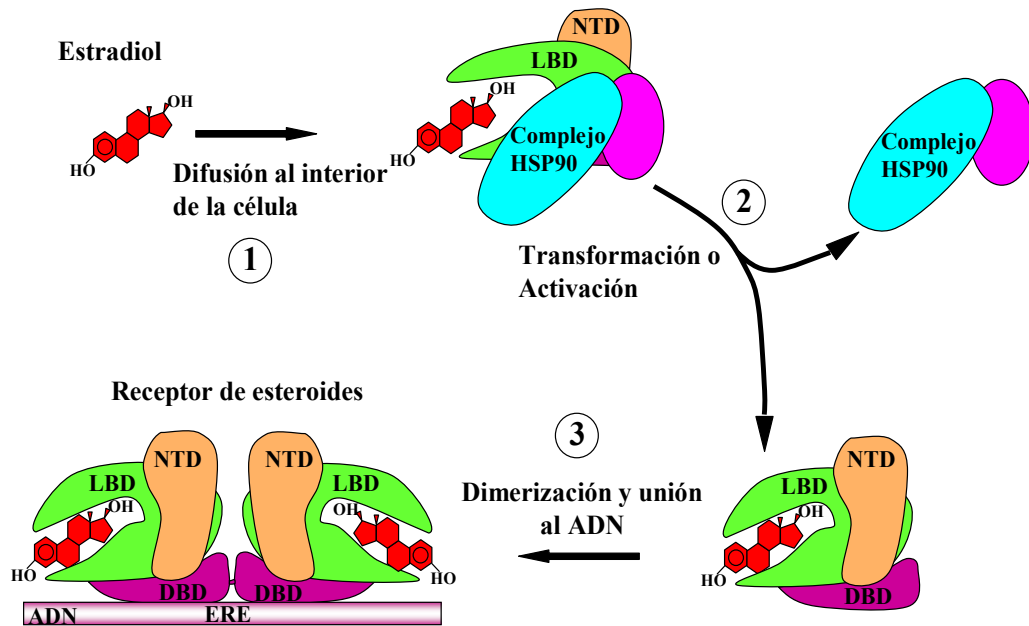
**Fig. 7. Esquema de las reacciones más importantes en la ruta metabólica del 17β-estradiol, la progesterona y la testosterona, que tienen lugar en el cerebro.** CYP11A (P450 scc): citocromo P450 que corta la cadena lateral del colesterol; CYP17 (P450 c17): citocromo P450 con actividad 17α- hidroxilasa / 17, 20 liasa; CYP7B1: citocromo P450 con actividad hidroxicoolesterol 7α -hidroxilasa; 3β-HSD: óxido-reductasa de los 3 β -hidroxiesteroides; 3α-HSD: óxido-reductasa de los 3 α -hidroxiesteroides; 17β-HSD: óxido-reductasa de los 17 β -hidroxiesteroides. (Esquema adaptado de Handa y cols., 2009)

### • Mecanismos de acción de las hormonas sexuales en el SNC

Debido a su naturaleza esteroide, las hormonas sexuales son capaces de entrar y salir de las células con facilidad atravesando la membrana plasmática y la envuelta nuclear. El mecanismo de acción clásico de las hormonas sexuales pasa por la unión a un receptor intracelular. El receptor de estrógenos, es miembro de la superfamilia de receptores nucleares (NR), que engloban además al receptor de la progesterona (PR) y los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides (GR y MR, respectivamente)

(Evans, 1988; Beato, 1989; Beato y Klug, 2000), el receptor de la vitamina D, receptores de retinoides, de la hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (Evans, 1988). En ausencia de ligando, los receptores de esta familia se localizan en el citoplasma, y normalmente para evitar su translocación al núcleo se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (HSPs) e inmunofilinas, formando un complejo que puede implicar al menos a 10 chaperonas, 5 de ellas parecen ser imprescindibles (HSP-70, HSP-90, DnaJ/HSP-40, p23 y Hop) y otras no tan esenciales, como la proteína BAG-1 o las inmunofilinas (FKBP52, FKBP51, ciclofilina 40 (Cyp40) y PP5). Las chaperonas regulan la estabilidad, la afinidad de los receptores por el ligando, e incluso su actividad transcripcional (Pratt y Toft, 1997; Cheung y Smith, 2000; Georget y cols., 2002). Una vez que el ligando se une al receptor, se producen en éste cambios conformacionales, que causan la disociación de las proteínas de choque térmico e inmunofilinas. Una vez disociado, el receptor dimeriza y forma homodímeros ( $ER\alpha$ - $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ - $ER\beta$ ) o heterodímeros ( $ER\alpha$ - $ER\beta$ ) (Cowley y cols., 1997; Pettersson y cols., 1997), se transloca al núcleo, recluta cofactores (coactivadores, correpresores y proteínas reguladoras de la transcripción) y se une a los elementos de respuesta específicos en el ADN, estimulando o reprimiendo la transcripción génica (Carson-Jurica y cols., 1990; McKenna y cols., 1999; McKenna y O'Malley, 2002; Onate y cols., 1995). Este modo de acción de las hormonas esteroideas ha sido denominado “genómico” o de señalización iniciada en el núcleo (Falkenstein y cols., 2000) (Fig. 8). Además, las hormonas sexuales también pueden desencadenar respuestas iniciadas en la membrana plasmática. Éstas son rápidas, de unos pocos segundos a minutos y no requieren de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario. Los mecanismos de acción rápida están mediados por receptores de membrana o por los propios receptores intracelulares que se asocian transitoriamente a la membrana plasmática (Razandi y cols., 1999, 2002; Chambliss y cols., 2002; Li y cols., 2003; Chaban y cols., 2004; Hirahara y cols., 2009). Estas vías de señalización implican la modulación de canales de calcio de membrana en una gran variedad de tipos celulares, la hiperpolarización neuronal, el aumento de la potenciación a largo plazo mediada por N-metil D aspartato (NMDA) en el hipocampo, la activación de rutas de las MAPK, JNK, PI3K/Akt o la proteína quinasa A y la activación de genes inmediatos, como c-fos (Lagrange y cols., 1995; Das y cols., 1997; Watters y cols., 1997; Benten y cols., 1999a, b; Gu y cols., 1999; Moss y Gu, 1999; Razandi y cols., 1999; Rosner y cols., 1999a, b; Singer y cols., 1999; Nadal y cols., 2000; Simoncini y cols., 2000; Singh y cols., 2000;

Kelly y Levin, 2001; Kahn y cols., 2002; Heinlein y Chang, 2002; Mize y cols., 2003; Wade y Dorsa, 2003), además de que también pueden regular secundariamente la actividad genómica de las hormonas sexuales iniciada en el núcleo y la actividad genómica de otros factores de transcripción (Heinlein y Chang, 2002; Falkenstein y cols., 2000).

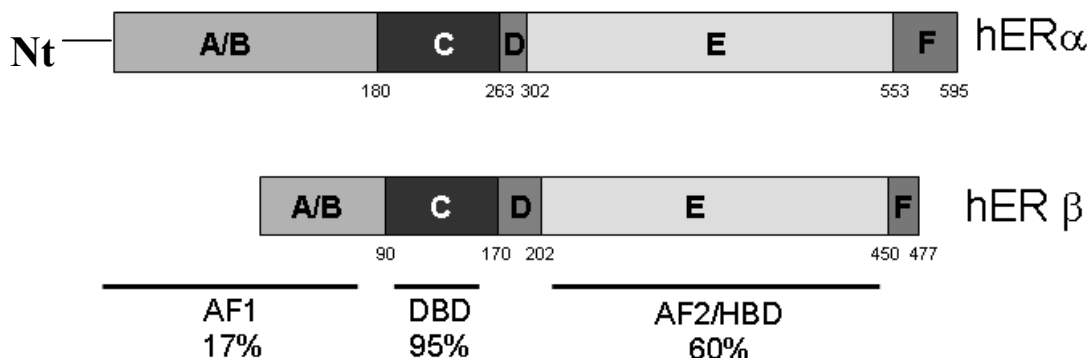


**Fig. 8. Mecanismo de activación genómica de los estrógenos a través de los receptores de estrógeno:** 1. Difusión del estradiol al interior de la célula. 2. Unión del ligando al receptor, cambio conformacional y desplazamiento del complejo de proteínas de choque térmico (HSP90). 3. Dimerización del receptor, translocación al núcleo y unión a los elementos de respuesta específicos (ERE) en el ADN. DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando; NTD: dominio amino N-terminal; ERE: elemento de respuesta a estrógenos.

### • Estructura y función de los receptores de estrógeno

Las acciones de los estrógenos son mediadas a través de sus 2 receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Greene y cols., 1986; Kuiper y cols., 1996; McEwen and Alves, 1999). Estas dos proteínas median la gran mayoría de los efectos de los estrógenos en multitud de sus tejidos diana como son el sistema reproductivo, el tejido mamario, el tejido óseo, el sistema cardiovascular, y por supuesto el SNC. Los dos ERs, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , están codificados por genes distintos y sin embargo ambos poseen todas las características esenciales de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares (NR) de hormonas esteroideas y tiroideas (Beato y cols., 1995). Su estructura es modular y define una serie de dominios funcionales presentes en todos los miembros de esta familia: un

dominio amino terminal, un dominio de unión al ligando y un dominio de unión al ADN (Fig. 9).



*Fig. 9. Estructura de los dos subtipos del ER. Se muestran los distintos dominios que conforman ambos receptores de origen humano, el número de los residuos que los limitan y el porcentaje de homología para algunos de ellos. En el dominio A/B reside la primera de las dos funciones de activación (AF) de los ERs. La otra está en el dominio E, que además es el responsable de unir el ligando (LBD). A través del dominio C, con un elevado grado de homología, los ERs se unen al ADN (DBD), concretamente a la secuencia AGGTCA que conforma los elementos de respuesta a estrógenos (ERE). hERα: receptor de estrógenos α humano; hERβ: receptor de estrógenos β humano; Nt: extremo N- terminal.*

Los receptores de estrógeno (Klein-Hitpass y cols., 1986; Evans, 1988; Beato y cols., 1996) pueden formar homo- o heterodímeros que se unen al elemento de respuesta a estrógenos. En algunos casos los receptores de estrógeno α y β tienen efectos antagónicos (Lindberg y cols., 2003) y se les ha considerado como dianas candidatas para posibles terapias neuroprotectoras y antiinflamatorias basadas en las acciones estrogénicas. La actividad de los ERs es regulada por su asociación con cofactores transcripcionales que tienen una expresión específica celular o tisular (Klinge, 2000; McKenna y O'Malley, 2002). Esta asociación depende de la conformación tridimensional de los receptores (Norris y cols., 1999), la cual es modificada por distintos ligandos estrogénicos (Brzozowski y cols., 1997; Paige et al. 1999; Pike 2006).

### • El estradiol en la fisiología reproductiva

El sistema nervioso central es un tejido diana para la hormona ovárica estradiol, un regulador de la fisiología reproductiva. El estradiol actúa en diferentes regiones del cerebro y la médula espinal, controlando los ciclos hormonales (Hung y cols., 2003), señalizando la liberación de la GnRH en el hipotálamo y el área preóptica media, que

induce a la secreción pulsátil de la LH por la hipófisis para la iniciación de la ovulación (Herbison, 1998), controlando el comportamiento reproductivo; como la receptividad sexual femenina (lordosis murina) (Micevych y cols., 2009) y acontecimientos no reproductivos, como la modulación de la función sináptica y la plasticidad, y afectando al estado anímico y cognitivo (Fink y cols., 1996; McEwen y cols. 1997; Woolley, 2007).

### • El papel neuroprotector y antiinflamatorio del estradiol en el SNC

Además, el estradiol es un factor neuroprotector que promueve la supervivencia neuronal y la integridad del tejido en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración (Garcia-Segura y cols. 2001, Maggi y cols., 2004, Suzuki y cols., 2006). Estudios recientes sugieren, al menos en parte, que el efecto neuroprotector del estradiol podría ser debido a su efecto antiinflamatorio sobre la microglía, reduciendo la inflamación en el cerebro. Se ha demostrado *in vitro* que el estradiol inhibe la expresión de mediadores inflamatorios liberados por la microglía (Bruce-Keller y cols., 2000, 2001; Drew y Chavis, 2000; Vegeto y cols., 2001; Baker y cols., 2004; Dimayuga y cols., 2005) y que reduce *in vivo* la reactividad de la microglía en diferentes modelos de inflamación cerebral (Vegeto y cols., 2003, 2006) y en una lesión cerebral (Barreto y cols., 2007). Estas acciones pueden ser altamente relevantes para las acciones neuroprotectoras del estradiol. Además, la regulación de la respuesta microglial a la inflamación podría representar un acercamiento terapéutico al control de la neurodegeneración.

### • La función metabólica del estradiol

Los estrógenos regulan el apetito y la ingesta afectando a la homeostasis metabólica (Butera y Beikirch, 1989; Bonavera y cols., 1994). En 1975, Beatty y cols., demostraron que las lesiones en la región hipotalámica basal (VMN/Arc) atenúan los efectos anoréxicos del estradiol administrado periféricamente en ratas ovariectomizadas. Más recientemente se ha detectado la expresión de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de estrógenos en determinadas regiones cerebrales implicadas en el balance energético, como el PVN, el VMN, el Arc y el LHA (Shughrue y cols., 1997; Orikasa y cols., 2002; Chakraborty y cols., 2003).

Numerosos trabajos muestran el papel que el estradiol ejerce sobre la producción de neuropéptidos hipotalámicos; la hormona produce un aumento de la expresión de POMC y de  $\alpha$ -MSH en el Arc en distintas especies (Broad y cols., 1993; Thornton y cols., 1994; Priest y Roberts, 2000; Pelletier y cols., 2007; Taylor y cols., 2007), reduce la expresión del NPY en el Arc y en el PVN de muridos con elevados niveles de NPY provocados por la ovariectomía (Bonavera y cols., 1994; Shimizu y cols., 1996; Ainslie y cols., 2001; Pelletier y cols., 2007) y también es capaz de reducir la expresión de  $\alpha$ -MSH en ratones macho obesos inducidos por la dieta y en ratas macho intactas (Mystkowski y cols., 2000; Morton y cols., 2004). El estradiol aumenta los niveles de orexina en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas (Silveyra y cols., 2009) y en ratas hembra intactas en las fases de proestro y estro, también se incrementan las concentraciones hipotalámicas de este neuropéptido (Porkka-Heiskanen y cols., 2004). En ratas macho con anorexia inducida por estrógenos se encuentra disminuida la expresión de MCH (Mystkowski y cols., 2000). Finalmente, el estradiol aumenta la expresión de CRH en el PVN de ratonas ovariectomizadas (Pelletier y cols., 2007).

Estudios previos han demostrado la influencia del estradiol en los niveles de leptina plasmáticos. En el ciclo menstrual las concentraciones de leptina más elevadas se alcanzan en la fase lútea (Lukaszuk y cols., 1998). Durante la primera mitad del embarazo se incrementan los niveles de leptina y caen bruscamente en el período postparto (Sivan y cols., 1998). Un estudio realizado en ratas ovariectomizadas demostró que los niveles plasmáticos de leptina estaban disminuidos con respecto a las ratas tratadas con estradiol (Alonso y cols., 2007). Además, en un experimento *in vitro* realizado en adipocitos, estimulados con estradiol, se ha visto que se incrementa la síntesis y la secreción de leptina (Machinal y cols., 1999).

El estradiol y la leptina cooperan en la regulación de la homeostasis energética en el hipotálamo y en el sistema reproductor (Gao y Horvath, 2008). Además, los receptores de estrógenos y leptina están localizados en neuronas de las áreas en las que se sabe que se coordina el metabolismo y la función gonadal, como el Arc, el VMN y el área preóptica (POA) (Diano y cols., 1998). El estradiol es capaz de regular la expresión hipotalámica del ObR (Kimura y cols., 2002; Rocha y cols., 2004).

#### **4. SERMs: Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno**

La terapia hormonal con estrógenos o con estrógenos y progesterona para el tratamiento de los síntomas asociados a la menopausia, se ha utilizado durante más de 50 años. A pesar de los beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva, especialmente a largo plazo, está limitado por el posible riesgo de desarrollar cáncer de mama y útero. En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y óseo, pero sin las consecuencias negativas que ejercen sobre la mama y el útero. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) son el objeto de nuevas vías de potenciales abordajes terapéuticos. Los SERMs constituyen un grupo de compuestos naturales o sintéticos, de estructura diversa, con capacidad de ejercer inducciones o represiones de la actividad de los ERs específicas de la célula y el tejido, actuando como agonistas de los ERs en algunos tejidos y como antagonistas en otros. Actualmente los SERMs son ampliamente utilizados en la clínica como tratamiento primario contra el cáncer y la osteoporosis. Los SERMs pueden además representar una alternativa al estradiol para el tratamiento o prevención de alteraciones neurodegenerativas (Cyr y cols., 2000; Dhandapani y Brann 2002; Littleton-Kearney y cols., 2002; Kimelberg y cols., 2003; Murphy y cols., 2003; Brinton, 2004; DonCarlos y cols., 2007; Prokai y Simpkins, 2007), ya que pueden tener acciones neuroprotectoras estrogénicas en el cerebro y ausencia de las acciones estrogénicas, o efectos antiestrogénicos, en otros tejidos, evitando los riesgos periféricos asociados con la terapia estrogénica. En un estudio previo se ha demostrado que dos de los SERMs de uso clínico en humanos, el tamoxifeno y el raloxifeno, son capaces de reducir la activación microglial *in vitro* (Suuronen y cols., 2005). En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de estos dos SEMRs sobre la activación microglial *in vivo* (Fig. 10).



## 5. La activación microglial en el SNC

- 38 -



activación de las vías de señalización de la respuesta inmune en las células de microglía residente ocurre no sólo en respuesta a organismos infecciosos, también durante la lesión cerebral (Cammermeyer, 1965; Hailer y cols., 1999; Streit y cols., 1999; Ladeby y cols., 2005) y enfermedades crónicas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer (Hanisch y Kettenmann, 2007; Rivest, 2009) y la esclerosis lateral amiotrófica (Henkel y cols., 2009). Además, en determinadas situaciones se puede producir un reclutamiento, proliferación y activación de los precursores de células microgliales de la sangre, que son detectados en las regiones afectadas del cerebro (Soulet y Rivest, 2008).

Hay diversos estudios que explican como la microglía se puede activar también, por el cese en los mecanismos que controlan la activación microglial. En el cerebro normal, el estado de activación microglial está controlado por la actividad eléctrica de las neuronas (Neumann y cols., 1996), por distintas neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la neurotrofina-3 (NT-3), y por sustancias liberadas durante la actividad neuronal normal como la noradrenalina (NA), la  $\alpha$ -MSH, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y PACAP, todas las cuales contrarrestan los efectos de activadores microgliales mediante el incremento de los niveles intracelulares de AMPc (McCluskey y Lampson, 2000; Aloisi, 2001). Una hipótesis involucra a los contactos célula-célula entre la microglía y las neuronas en el inicio de la activación microglial: la expresión constitutiva de CD200 por las neuronas mantendría inactiva a la microglía, que expresa el receptor para esta proteína de membrana (CD200R). La pérdida de integridad de la neurona provocaría la ausencia del ligando (CD200), induciendo la expresión por parte de la microglía de un fenotipo activado (Hoek y cols., 2000; Wang y cols., 2007).

La microglía activada puede ejercer una acción neuroprotectora (Polazzi y cols., 2001; Polazzi y Contestabile, 2002) mediante la secreción de productos que son beneficiosos para la función neuronal, como el IGF-1 (Zhao y cols., 2006; Mason y cols., 2001), la tromboespondina (Chamak y cols., 1994), el bFGF y el NGF (Heumann y cols., 1987), la IL-1 (Wang y cols., 2008; Lai y Todd, 2008) o la IL-6 (Juliet y cols., 2008; Sawada y cols., 1995; Bruce-Keller, 1999), el TNF- $\alpha$  (Cheng y cols., 1994) o diversos prostanoídes (Minghetti y Levi, 1998). Además, la microglía activada parece necesaria para la remodelación del tejido nervioso dañado (Prewitt y cols., 1997; Moller

y cols., 2000). Su capacidad fagocítica le permite retirar los restos celulares y la mielina, inhibidora del crecimiento axonal (Cadelli y cols., 1992; Frisen y cols., 1994). También puede mediar la muerte de los oligodendrocitos inhibidores de la regeneración (Lotan y cols., 1994). No obstante, aunque la respuesta de activación aguda de la microglía tiene un carácter protector, el efecto de estas células puede ser nocivo en los casos de activación crónica, además, una activación exagerada y crónica de la activación microglial podría conducir a la neurotoxicidad y podría ser perjudicial para el tejido nervioso (Thomas, 1992; Streit y cols., 1999; Polazzi y Contestabile, 2002; Depino y cols., 2003; Kim y de Vellis, 2005, Marchetti y Abbracchio, 2005; Minghetti, 2005; Suzumura y cols., 2006, Block y cols., 2007).

## **HIPÓTESIS**

## **Hipótesis general**

La inflamación sistémica crónica inducida por el estado de sobrepeso o por patógenos modula los niveles circulantes de citoquinas como la leptina, que a su vez afecta a la activación microglial, la producción de citoquinas centrales y la respuesta a moduladores neuroendocrinos como el estradiol y la leptina, que vinculan las respuestas inmune y neuroendocrina en estos procesos fisiopatológicos.

## **Hipótesis específicas**

- El sobrepeso, la leptina y el estradiol pueden regular la activación de la microglía y la acción de citoquinas como la IL-6 en el sistema nervioso central.
- Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno pueden regular el peso corporal, los niveles de leptina, la activación de la microglía y la acción de citoquinas como la IL-6 en el sistema nervioso central.

## **OBJETIVOS**

1. Determinar el efecto del sobrepeso y de un tratamiento crónico de leptina icv sobre la activación microglial en el hipotálamo y cerebelo.
2. Estudiar la modulación de la IL6, de su receptor (IL-6R $\alpha$ ) y los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$ , en el hipotálamo y cerebelo de las ratas con sobrepeso o tratadas con leptina *icv*.
3. Investigar el efecto de la leptina y el estradiol sobre la activación microglial y la expresión de la IL-6 y su receptor, así como sus efectos cuando están combinados entre sí o con el LPS, en un modelo *in vitro*.
4. Analizar si los compuestos estrogénicos afectan a los cambios de peso corporal, a los niveles de leptina séricos, a la activación microglial, y a la expresión del sistema de IL-6 en el cerebelo, inducidos por un modelo de inflamación *in vivo*.
5. Estudiar si el tiempo de ovariectomía influye en la respuesta a la inflamación central inducida por el LPS sistémico y la capacidad de responder a los compuestos estrogénicos.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO**

### **1.1 Muestras de tejido cerebral de rata**

Para todos los experimentos se emplearon ratas adultas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza *Wistar*. Los animales se obtuvieron de la cría en los animalarios de la Universidad Complutense de Madrid y la Universidad de Córdoba. Los animales fueron criados en condiciones estándar: 22 + 2 °C de temperatura, humedad relativa del ambiente entre 50 y 55%, ciclos de luz-oscuridad 12h:12h, alimentación con pienso artificial equilibrado para roedores (Panlab, Barcelona, España) y libre disponibilidad de agua. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (86/609/EEC). Se procuró emplear el menor número de animales en cada diseño experimental. Los animales operados recibieron un trato cuidadoso y se procuró evitarles sufrimiento innecesario. Todos los animales fueron anestesiados antes de cualquier intervención quirúrgica. El estado de sedación se determinó como la ausencia de reflejo de retirada en respuesta a un estímulo táctil en la cola y la planta del pie y ausencia del reflejo palpebral al estimular la superficie del ojo.

### **1.2 Líneas celulares**

Los estudios *in vitro* se han llevado a cabo en una línea tumoral de ratón denominada BV-2 de microglía, adquirida en el cell bank Interlab Cell Line Collection (ICLC). Esta línea se expandió en placas P100 Sterilin (BD, Biosciences, Madrid, España) utilizando medio RPMI (1640, GibcoBrl) suplementado con 2mM de L-Glutamina, 1% de antibiótico estreptomycin, al que se le añadió suero fetal de ternera al 10% inactivado por calor, al baño maría durante 30 minutos a 57 °C. Se realizaron pases 1:10 para su mantenimiento. El medio de cultivo fue reemplazado 2 veces por semana aproximadamente. Para evitar posibles modificaciones en las líneas celulares, cada cultivo fue sometido a un máximo de cuatro pases.

Debido al crecimiento en semisuspensión de las células BV-2, para despegarlas, empleamos un raspador recogiendo las células adheridas débilmente al sustrato y las que crecían en suspensión, realizando una centrifugación posterior de 400g 5'. (Todas las soluciones usadas para cultivos son de Invitrogen, GibcoBrl, Barcelona, España).

El subcultivo se realizó en placas P60 Sterilin con un recubrimiento de poli-D-Lisina a una concentración de 50µg/ml (P0899, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España),



con el fin de anclar las células al sustrato de la placa. La densidad a la que se sembraron fue de 50.000 células/ cm<sup>2</sup>, tanto para el análisis de las proteínas mediante Western blotting como para el estudio de la expresión de genes por RT-PCR. El medio de subcultivo es igual al de expansión, con la salvedad de que el porcentaje de suero empleado es del 0.1%, reduciendo la posibilidad de que alguna de las hormonas que pudiera contener el suero fetal de ternera, interfiriera en nuestros resultados.

## **2. PROTOCOLOS GENERALES**

### **2.1 Ovariectomía**

La resección quirúrgica completa y bilateral de las gónadas se realizó en los animales profundamente anestesiados, con una mezcla de halotano (Fluothane, AstraZeneca Farmacéutica, Madrid, España) y aire (oxígeno medicinal) al 2-3%. Para la inducción de la anestesia, la concentración de la mezcla se elevó al 5%. Con el fin de evitar una hipotermia excesiva, los animales permanecieron sobre una manta calefactora (37 °C aproximadamente) durante todo el proceso quirúrgico. Se escogió la ruta de acceso dorsal para proceder a la ovariectomía, tomando como referencia las vértebras lumbares. Una vez rasurada y desinfectada la piel, se hizo una incisión medial única, desde la cual se accedió a la musculatura abdominal de cada uno de los lados del animal. Seguidamente se separaron los correspondientes paquetes musculares, con la punta de unas tijeras romas, para dar acceso a la cavidad peritoneal. Con unas pinzas se sacó la grasa peritoneal de la región lumbar, en la cual está embutido el ovario, y se hizo un lazo, con sutura reabsorbible estéril (31003, Ercelab, España), alrededor de la parte distal del oviducto. Por último se resecó completamente el ovario y se suturaron el músculo, con seda estéril (555157, Ercelab) y la piel, con grapas quirúrgicas. El proceso se repitió con el ovario del otro lado del animal.

### **2.2 Implantación de minibombas osmóticas**

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isofluorano y aire al 2 % (Isoba vet, Centauro, Masies de Roda, España) y se colocaron en un aparato estereotáxico Kopft, con la barra de los dientes incisivos situada en la posición de -3,5 mm. Se tomaron las coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Después de rasurar y limpiar la zona con etanol, se

realizó una incisión con bisturí en el cuero cabelludo y se practicó una trepanación longitudinal en el cráneo con una broca. Las coordenadas empleadas fueron 0,16 mm lateral y 0,8 mm caudal a bregma. Con unas tijeras de punta roma desbridamos a un lado de la columna vertebral formando un bolsillo subcutáneo y colocamos la bomba con unas pinzas de hemostasia, a continuación desplazamos la cánula de la bomba por el orificio del cráneo y añadimos cemento para que no se desplazara la cánula, finalmente se suturó la piel de la cabeza con grapas. La bomba empleada fue una mini-bomba osmótica (Alzet, DURECT Co., Cupertino CA, Estados Unidos) con una velocidad de liberación de 0,25 µl/hora.

## **2.3 Diseño experimental**

- **MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO***

### **2.3.1 MODELO DE SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL: Implicación del exceso de peso en el estado de activación microglial, en el sistema de IL-6/IL-6Rα y en la regulación del neuropéptido MCH.**

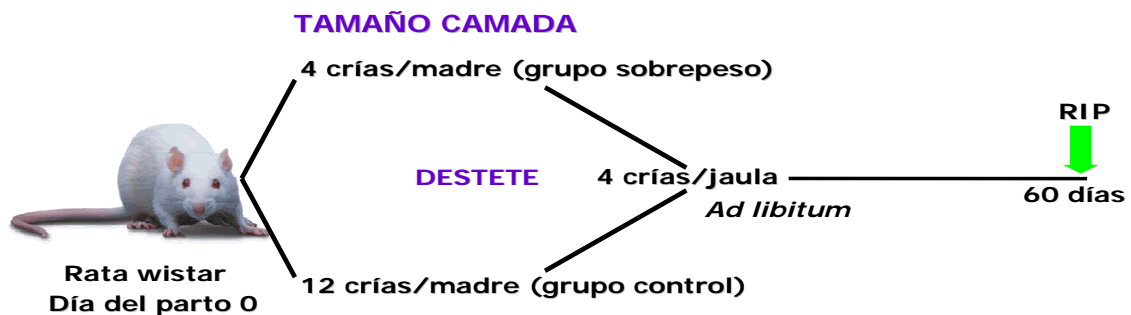
Estudiamos cómo el sobrepeso, al igual que la obesidad que está considerada como un estado patológico de inflamación moderado pero crónico, pudiera afectar a la inflamación microglial. Para ello se empleó un modelo puesto a punto en el laboratorio del Dr. Manuel Tena-Sempere en la Universidad de Córdoba y basado en generar camadas con un bajo número de crías, para que recibieran una sobrenutrición materna en comparación a los animales de camadas con un número normal de crías (You y cols 1990).

El modelo se desarrolló de la siguiente forma; en el día del parto se ajustaron las camadas a 4 o 12 crías por madre. Después del destete (21 días) se redistribuyeron las ratas en grupos de 4 crías por jaula y fueron alimentadas *ad libitum*, hasta los dos meses de edad, momento en el que fueron sacrificadas por perfusión (Fig.11).

En el hipotálamo y cerebelo se analizaron mediante Western blotting los niveles de la IL-6 y su receptor y por inmunohistoquímica en cortes de 50 µm, se estudiaron los siguientes marcadores:

- La activación microglial mediante la cuantificación de células inmunorreactivas frente al complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II)
- Las modificaciones cualitativas de la IL-6
- Los cambios en la distribución anatómica del IL-6R $\alpha$
- Las variaciones en la población de neuronas IL-6R $\alpha$  positivas productoras de MCH.

Mediante inmunohistoquímica doble observamos la colocalización de las neuronas MCHérgicas que immunoexpresaban el receptor de IL-6 en el hipotálamo.



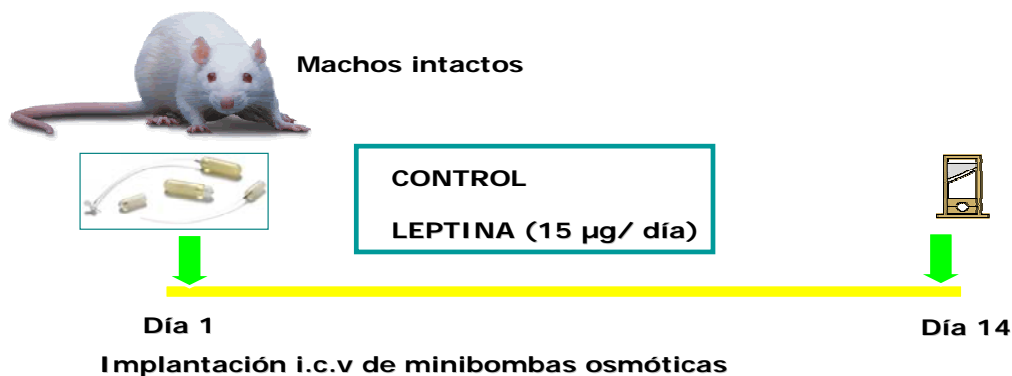
*Fig.11. Figura representativa del modelo experimental de sobrenutrición postnatal.*

### **2.3.2 MODELO DE TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV): Efectos sobre la activación microglial, el sistema de IL-6/IL-6R $\alpha$ y los ERs**

Con el fin de estudiar el posible efecto de la leptina en la activación de la microglía se emplearon 6 ratas macho de 3 meses de edad Wistar, para el grupo control que recibieron una minibomba con suero salino (vehículo) y otros 6 con implantación de una minibomba que liberaba leptina (400-21, Peprotech, Rocky Hill, NJ, Estados Unidos) a una dosis de 15  $\mu$ g/día, intracerebroventricularmente (Hao y cols, 2006). El tratamiento se prolongó 14 días, durante los cuales las ratas se pesaron a diario, hasta que finalmente fueron sacrificadas por decapitación (Fig. 12).

Se valoró el efecto del tratamiento con leptina en la activación microglial mediante inmunohistoquímica frente a MHC-II en secciones de 20  $\mu$ m y mediante

Western blotting, se analizaron los niveles de la IL-6, el IL-6R $\alpha$  y los receptores de estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ .



**Fig.12.** Figura representativa del modelo experimental de tratamiento crónico con leptina (icv)

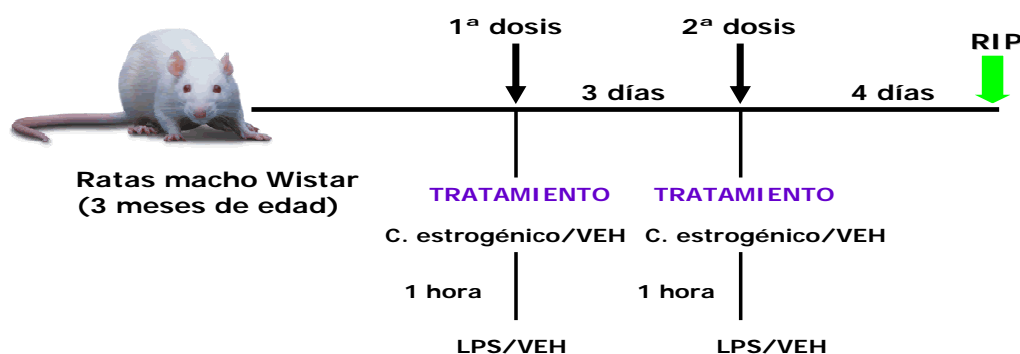
### **2.3.3 MODELO DE INFLAMACIÓN *IN VIVO*: Modulación de la activación microglial, el sistema de IL-6/IL-6R $\alpha$ y los ERs en el cerebelo, por efecto del LPS y varios compuestos estrogénicos**

Investigamos cómo en el modelo de inflamación sistémico por LPS, el 17 $\beta$ -estradiol, agonistas del receptor de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (PPT y DPN, respectivamente) y los SERMs, tamoxifeno y raloxifeno, modulan la inflamación microglial en el cerebro. Para ello hemos tratado a los animales con lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli* 055:B5 (L2880, Sigma-Aldrich). Los compuestos estrogénicos probados fueron: el 17 $\beta$ -estradiol (E2758, Sigma-Aldrich), tamoxifeno (T5648, Sigma-Aldrich), raloxifeno (R1402, Sigma-Aldrich), PPT (4,4',4''-(4-Propil-[1H] pirazol-1,3,5-triil) trisfenol) y DPN (2,3-bis (hidroxifenil) propionitrilo) (1426 PPT y 1494 DPN; Tocris, Bristol, Gran Bretaña).

El protocolo experimental de tratamiento con LPS está basado en un estudio de inducción del complejo MHC-II en ratas inyectadas con LPS (Ng y Ling, 1997). Las dosis de compuestos estrogénicos están basadas en estudios anteriores sobre su efecto neuroprotector en un modelo de excitotoxicidad (Ciriza y cols, 2004). Las dosis de PPT y DPN están escogidas de entre un amplio rango de dosis descritas en la literatura (Dai y cols, 2007; Garrido-Gracia y cols, 2007; Sánchez-Criado y cols, 2006).

Planeamos 3 grupos experimentales: 1) ratas macho a los que se trató a los 3 meses de edad 2) hembras que fueron ovariectomizadas a los 3 meses de edad y tratadas 7 días después de la ovariectomía y 3) hembras que fueron ovariectomizadas a los dos meses y 7 días de edad y tratadas al mes siguiente. Para cada tratamiento experimental se estudiaron entre 4 y 8 animales. En los grupos control de la inflamación (vehículo más LPS) se incluyó un número mayor de animales, 16 en el caso de las hembras de una semana de ovariectomía, 9 en el grupo de ratas de un mes de ovariectomía y 16 en el caso de los machos. Se administraron dos inyecciones subcutáneas de distintos compuestos estrogénicos:  $17\beta$ -estradiol, tamoxifeno, raloxifeno, PPT y DPN, o vehículo (40  $\mu$ l/mg de dimetilsulfóxido (DMSO), en solución salina al 0,9%) y dos inyecciones intraperitoneales de LPS de *Escherichia coli* (005-B5, L2880, Sigma-Aldrich) o vehículo, preparado en tampón fosfato salino 0,1M (pH 7,4). En primer lugar se administró el compuesto estrogénico y 1 h después se inyectó la primera dosis de LPS (1 mg/Kg). Al cabo de 3 días se administró una segunda inyección del compuesto estrógeno y 1 hora más tarde la segunda dosis de LPS (1,33 mg/Kg). Las dosis de los compuestos estrogénicos fueron iguales en las dos inyecciones. Los animales fueron sacrificados a los 4 días de la segunda inyección. Se incluyeron tres grupos control: (1), grupo tratado con el vehículo del compuesto estrogénico y el vehículo del LPS (2), grupo tratado con el vehículo del compuesto estrogénico y con LPS y (3), grupo tratado con el compuesto estrogénico y el vehículo del LPS (Figs. 13 y 14).

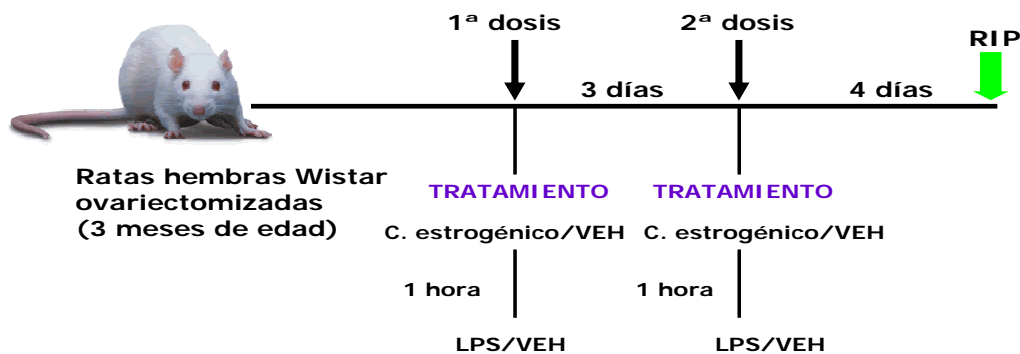
En el grupo de los machos se probaron varias dosis distintas de  $17\beta$ -estradiol (50, 250, 500 y 700  $\mu$ g/kg), tamoxifeno (0,5, 1 y 2 mg/kg) y raloxifeno (0,5, 1 y 2 mg/kg).



**Fig.13.** Figura representativa del modelo experimental de inflamación realizado en ratas macho wistar.

En el grupo de hembras de una semana de ovariectomía las dosis ensayadas fueron: 17 $\beta$ -estradiol (50, 250 y 500  $\mu$ g/kg), tamoxifeno (0,5, 1 y 2 mg/kg), raloxifeno (0,5, 1 y 2 mg/kg), PPT (2,4, 1,2, 0,6 mg/kg), DPN (2,4, 1,2, 0,6 mg/kg) y la combinación de PPT más DPN con las 3 dosis.

En el grupo de ratas de un mes de ovariectomía las dosis empleadas fueron: 17 $\beta$ -estradiol (250  $\mu$ g/kg), tamoxifeno (0,5 y 1 mg/kg) y raloxifeno (0,5 y 1 mg/kg).



**Fig.14.** Figura representativa del modelo experimental de inflamación realizado en ratas con tiempo de ovariectomía de una semana y un mes.

A los siete días del inicio del tratamiento los animales fueron perfundidos. Mediante inmunohistoquímica en cortes de 50  $\mu$ m, estudiamos en el cerebelo, los siguientes parámetros:

- La activación microglial (MHC-II)
- La población total de microglía (OX-42)
- Las modificaciones cualitativas de la IL-6
- Los cambios en la inmunorreactividad de IL-6R $\alpha$  en las neuronas de Purkinje

En el grupo de hembras de una semana de ovariectomía tratadas con LPS y grupo control se analizaron también los niveles séricos de leptina.

- **MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO***

#### **2.3.4 MODELO DE INFLAMACIÓN *IN VITRO*: Acción del LPS, la leptina, el estradiol y la IL-6 en la activación microglial, el sistema de IL-6/IL-6R $\alpha$ y el ER $\beta$**

Diseñamos este experimento con el fin de averiguar el efecto de la leptina y del 17 $\beta$ -estradiol en las células BV-2 activadas por LPS. Se emplearon diferentes dosis de leptina (0,01, 0,1, 1, 5 y 10  $\mu$ g/ml) y de 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  M) en combinación con el LPS (1 $\mu$ g/ml). Las dosis de leptina fueron extraídas de un trabajo sobre la acción de la leptina en la producción de IL-1 $\beta$  en cultivos primarios de microglía (Pinteaux y cols, 2007) y las de 17 $\beta$ -estradiol y LPS están basadas en un estudio anterior sobre el efecto del estradiol en la expresión de mediadores inflamatorios en respuesta a LPS en las células BV-2 (Baker, 2004).

El procedimiento experimental fue el siguiente, las células se sembraron a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en medio suplementado con 0.1% de suero fetal inactivado, al día siguiente se añadieron los tratamientos y se mantuvieron durante 24 horas, pasado este tiempo las células fueron lisadas y se llevaron a cabo los protocolos de extracción de proteína y ARN anteriormente detallados. Cada experimento fue reproducido un mínimo de 3 veces (Fig.15).

Se incluyeron 3 grupos control: (1), grupo tratado con el vehículo del tratamiento; 17 $\beta$  -estradiol (DMSO en medio RPMI) o leptina (solución salina 0.9%) y el vehículo del LPS (solución salina 0.9%) (2), grupo tratado con el vehículo del 17 $\beta$  -estradiol o leptina y con LPS y (3), grupo tratado con 17 $\beta$  -estradiol o leptina y el vehículo del LPS.

Para investigar si la regulación del IL-6R $\alpha$  está mediada por el 17 $\beta$ -estradiol en estas células de microglía, realizamos un experimento en el que se estimuló a las células con IL-6 a una dosis de 10ng/ml, previamente descrita en varios trabajos (Shozu y cols, 1997; Ahmed y cols, 2007; Lipnik-Stangelj and Carman-Krzan, 2005) y 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-11}$  M) y con la combinación de ambos. Los controles fueron tratados con el vehículo de la IL-6 (1mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) en solución salina 0.9%) y del 17 $\beta$ -estradiol.

Para estudiar el efecto combinado de la leptina y el estradiol en la regulación del IL-6R $\alpha$ , realizamos un ensayo en el que se trató a las células con leptina, estradiol o la combinación de ambos estímulos.

Mediante Western blotting, analizamos los niveles de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la enzima SOCS-3, el IL-6R $\alpha$  y el ER $\beta$ . Estudiamos además, la expresión del gen de la IL-6 por PCR cuantitativa.



*Fig.15. Figura representativa del modelo experimental de inflamación in vitro realizado en las células de microglía BV-2.*

## 2.4 Procesamiento de los tejidos

### 2.4.1 Perfusión

Los estudios de inmunohistoquímica del modelo de inflamación *in vivo* y obesidad exógena, se llevaron a cabo sobre tejido fijado por perfusión.

Las ratas fueron anestesiadas profundamente con 2,2,2- tribromoetanol (0,2 g/Kg, Fluka Chemika) y perfundidas a través de la arteria aorta (ruta transcárdial) con 50 ml de solución salina (NaCl al 0,9% en agua destilada), seguidos de 200 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato de Sorensen 0,1 M (pH 7,4). Los cerebros se mantuvieron en post-fijación por inmersión durante 4 horas en la misma solución de paraformadehído. Una vez fijados, los cerebros se cortaron a un grosor de 50  $\mu$ m, con un Vibratomo Leica VT1000S (Heidelberg, Alemania). Los cortes obtenidos se almacenaron hasta su uso a -15 °C en una solución crioprotectora compuesta por 30% de etilenglicol, 30% de sacarosa y 60% de tampón fosfato 0,1M.

A las ratas del experimento de inflamación *in vivo*, tras la anestesia e instantes antes de realizarles la perfusión se les extrajo la sangre; mediante una punción cardíaca se les succionó toda la sangre directamente del corazón. Las muestras sanguíneas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugaron a 5000 rpm



durante 5 minutos a 4 °C para separar el suero, que se recolectó y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

#### **2.4.2 Congelación**

Para los estudios de inmunohistoquímica y Western blotting en el tejido del modelo de tratamiento crónico con leptina, se procedió a sacrificar al animal, previamente anestesiado con CO<sub>2</sub>, por decapitación con una guillotina, entre la primera y segunda vértebras cervicales. Se extrajo el cerebro y se aislaron las zonas de interés e inmediatamente se introdujo el tejido en nieve carbónica, manteniéndolo congelado a -80 °C hasta su empleo. Para los estudios histológicos, se realizaron cortes del tejido a un grosor de 20 µm, con un Criostato (CM 1900, Leica).

### **2.5 Inmunohistoquímica y tinciones celulares**

#### **2.5.1 Marcaje simple por inmunoperoxidasa**

La inmunohistoquímica simple fue llevada a cabo en flotación, en secciones procedentes de Vibratomo, y sobre portaobjetos en secciones cortadas en congelación con un Criostato. Las incubaciones con los anticuerpos y los lavados se realizaron en agitación moderada, utilizando una solución de lavado. Esta solución estaba compuesta por tampón fosfato salino 0,1M; pH 7,4 (PB), 0.3% de Triton X-100 y 0,3% de BSA. El protocolo empleado fue el siguiente: en primer lugar, se lavaron las secciones con tampón fosfato salino 0,1M (PBS) para eliminar los restos de crioprotector y realizamos los siguientes lavados con solución de lavado (3 veces durante 10 minutos). A continuación, se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido, incubando las secciones en PB con 3% de peróxido de hidrógeno y 30% de metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar profusamente, se incubaron los cortes una noche o dos noches con el anticuerpo primario de interés; frente a microglía reactiva (MHC-II), microglía total (OX-42), astrocitos reactivos (Vimentina), IL-6, y su receptor (IL-6 R $\alpha$ ) o células en proliferación (P-Histona 3), diluido en solución de lavado con un suplemento de 3% de suero de cabra (NGS), a excepción del anticuerpo primario frente a MCH generado en cabra, en cuyo caso se realizó un bloqueo previo con 3% de BSA en solución de lavado durante 1 hora. Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados y se incubó el tejido durante 2 horas con el anticuerpo secundario diluido 1:300 a temperatura ambiente. Para amplificar la señal de los

anticuerpos de ER $\alpha$  y ER $\beta$  se empleó un kit de amplificación con tiramida (TSA Biotin System NEL700; NEN Life Science Products, Boston, MA, Estados Unidos) según las especificaciones del fabricante.

Para la evaluación en el microscopio de luz transmitida, se utilizaron anticuerpos secundarios generados en cabra y en conejo, conjugados con biotina (ver Tabla 1). En este caso, los cortes fueron incubados posteriormente con un complejo de avidina-biotina peroxidada (ABC 32020; PIERCE, Rockford, IL, USA) diluido 1:500 en solución de lavado. El producto de reacción de la peroxidasa se reveló incubando las secciones en una solución de diaminobencidina (DAB) al 0,03% (D4418, Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS 0,1 M. A continuación, las secciones en flotación fueron montadas en portaobjetos gelatinizados. Todas las muestras fueron posteriormente deshidratadas, cubiertas con DEPEX (BDH Laboratory Supplies, England) y observadas con un microscopio Leica (DMRB-E, Heidelberg, Alemania).

### **2.5.2 Marcaje doble por inmunoperoxidasa frente a IL6-R $\alpha$ y MCH**

La doble inmunohistoquímica fue realizada con el fin de colocalizar el receptor de IL-6 con las neuronas MCHérgicas en el cerebro. Las secciones en flotación fueron incubadas con el anticuerpo primario frente a MCH durante 2 noches a 4 °C. A los dos días, fueron lavadas en solución de lavado e incubadas con el anticuerpo secundario generado en conejo, contra inmunoglobulinas G de cabra, conjugado con biotina, seguidamente las secciones se lavaron y a continuación se incubaron durante 1 hora con el complejo ABC, revelando con DAB, siguiendo el protocolo ya descrito. Después del revelado, se realizaron lavados a fondo y se incubaron las secciones con el anticuerpo frente al IL6-R $\alpha$ , durante 2 noches a 4 °C, siguiendo el mismo protocolo, y empleando un anticuerpo secundario generado en cabra, contra inmunoglobulinas G de conejo, conjugado con biotina. En el proceso del revelado añadimos a la mezcla de DAB y 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sulfato de níquel-amonio (concentración final del 2%) y cloruro de cobalto (concentración final del 2%) con el fin de intensificar la reacción y facilitar la visualización del segundo marcaje, adquiriendo un tono grisáceo.

### **2.5.3 Inmunohistoquímica doble por fluorescencia**

La doble inmunohistoquímica fue realizada con el fin de averiguar la colocalización de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  con el marcador de células de microglía OX-42. Las secciones fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios durante 2 noches a 4 °C (ver Tabla1). Transcurrido este tiempo se lavaron con solución de lavado e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad con anticuerpos secundarios anti IgG, combinados con alexa 488 (verde) ó 594 (roja) (ver Tabla 1). Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 6000B microscope. Heidelberg, Alemania).

### **2.5.4 Controles de especificidad**

En las pruebas inmunohistoquímicas se llevaron en paralelo distintos controles de especificidad. Sólo se consideraron válidas para estudio las pruebas en las que estos controles aparecían sin marcaje:

*-Omisión del anticuerpo primario:* realizado para descartar que la señal se debiera a uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios o a fondo derivado de otras etapas del proceso.

*-Control de reactividad cruzada:* empleado en los experimentos de colocalización, para descartar posibles interferencias entre las dos parejas de anticuerpos. Se incubaron las secciones con cada uno de los anticuerpos primarios por separado y a continuación con ambos anticuerpos secundarios marcados con alexas verde y roja.

*-Control de autofluorescencia:* Para descartar fluorescencia intrínseca del tejido, se incluyeron cortes incubados en ausencia tanto del anticuerpo primario como del secundario.

### **2.5.5 Tinción con verde de metilo**

Se empleó como tinción general de núcleos celulares. La solución se preparó empleando verde de metilo (M 8884; Sigma) disuelto al 0,5% en tampón acetato sódico 0,1 M pH: 4,2. Se incubaron los cortes durante 3 minutos en solución de verde de metilo y se aclararon con baños de alcoholes de concentración creciente (3 minutos aproximadamente por baño).

**TABLA 1. ANTICUERPOS EMPLEADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA**

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA
<b>ED-1 (anti CD68)</b>	Ratón	1:1000	SEROTEC
<b>ER<math>\alpha</math> (MC-20)</b>	Ratón	1:300	SC 542; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
<b>ER<math>\beta</math></b>	Conejo	1:500	51-7900; ZYMED
<b>ER<math>\beta</math></b>	Pollo	1:200	14021; ABCAM
<b>IL-6</b>	Conejo	1:100	500-P73; PEPROTECH
<b>IL-6R<math>\alpha</math> (M-20)</b>	Conejo	1:150	Sc-660; SANTA CRUZ
<b>MHC-II (MRC-OX6)</b>	Ratón	1:300	MCA46G; SEROTEC
<b>P-Histona 3</b>	Ratón	1:500	9715; CELL SIGNALLING TECHNOLOGY
<b>Pro-MCH (C-20)</b>	Cabra	1:750	SC-14509; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
<b>OX-42 (CD-11b)</b>	Ratón	1:300	MCA275G; SEROTEC
<b>VIMENTINA (9)</b>	Ratón	1:500	M0725; DAKO
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA
<b>Cabra anti IgG de conejo biotinado</b>	Cabra	1:300	31820; PIERCE
<b>Cabra anti IgG de ratón biotinado</b>	Cabra	1:300	31800; PIERCE
<b>Conejo anti IgG de cabra biotinado</b>	Conejo	1:300	31732; THERMO SCIENTIFIC
<b>Cabra anti IgG de ratón Alexa roja</b>	Cabra	1:1000	A-11020, MOLECULAR PROBES
<b>Cabra anti IgG de conejo Alexa verde</b>	Cabra	1:1000	A-11008, MOLECULAR PROBES
<b>Cabra anti IgG de pollo Alexa verde</b>	Cabra	1:1000	703-096-155; JACKSON ImmunoResearch Laboratories

## **2.6 MÉTODOS DE VALORACIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

### **2.6.1 Análisis morfométrico: La técnica del disector óptico**

El avance más importante en el recuento estereológico o no sesgado de estructuras microscópicas fue la introducción del método del disector (Sterio, 1984). El disector consiste en la obtención de parejas de secciones separadas por una distancia conocida. El recuento de una partícula incluida en la estructura sólo es válido si aparece contenida en una sección y no en la siguiente. El problema de este método reside en la obtención de parejas de secciones de distancia conocida, que cumplan una probabilidad uniforme de que aparezca el objeto de interés. Para salvar este problema y obtener un aumento de la eficacia de recuento, se puede utilizar un método de barrido continuo. En microscopía óptica se puede obtener este barrido si se utilizan “secciones ópticas” dentro de un corte de cierto grosor. Eso se lleva a cabo determinando el grosor de una sección y barriendo toda la altura de la misma con el foco del microscopio, determinando como límite superior las primeras células que aparezcan enfocadas. Esto se conoce como “disector óptico”, y es el principio que hemos aplicado en la mayoría de nuestros experimentos, de la manera que lo describen Howard y Reed (1998).

### **2.6.2 Análisis estereológico en el modelo de sobrenutrición postnatal**

- **Células MHC-II inmunorreactivas**

Empleamos un modelo de sobrenutrición postnatal con ratas Wistar, para estudiar el potencial efecto del sobrepeso en la activación microglial en cerebro, centrándonos en el hipotálamo, y el cerebelo de estos animales. Analizamos varios núcleos del hipotálamo: PVN, VMH, DMN y Arc. Analizamos también el quiasma óptico (OX) y la eminencia media (EM). Debido a la baja densidad de células MHC-II inmunorreactivas presentes en el hipotálamo de estas ratas no resultó posible realizar un recuento aplicando los principios del disector óptico. Por este motivo, para estimar el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II, contabilizamos el número total de perfiles celulares por animal en 6 cortes (50µm) de una serie consecutiva, calculando el promedio de perfiles celulares por corte.

En el cerebelo, también obtuvimos muy baja densidad de células MHC-II inmunorreactivas. Estimamos el número de células totales en sustancia blanca de cerebelo en 9 cortes de 50 µm, en una serie consecutiva.

- **Células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas**

En el hipotálamo, las células que presentaron mayor inmunorreactividad frente a IL-6R $\alpha$  fueron las neuronas de la ZI, las áreas hipotalámicas dorsal (DA) y lateral (LHA) y el área periventricular próxima al núcleo dorsal (Pe). El recuento de células en estas regiones fue estimado por el método del disector óptico (Howard & Reed 1998) empleando el grosor total de la sección como altura del disector (Hatton y von Bartheld 1999) y varios visores de recuento dependiendo de la zona estudiada: (ZI) 144 x 144  $\mu\text{m}$ , (DA) 250 x 250  $\mu\text{m}$ , (LHA) 100 x 100  $\mu\text{m}$ , (Pe) 250 x 250  $\mu\text{m}$ . Los recuentos se realizaron en 3 ó 4 cortes por animal y se contaron 22 campos por corte. El grosor de los cortes, en este caso de 50  $\mu\text{m}$ , se midió utilizando un mecanismo digital de medida de longitud (microcator, Heidenhain-Metro MT 12/ND221, Traunreut, Alemania), acoplado a un microscopio Leitz. Este método consiste en hacer un barrido continuo de la altura de la sección con el foco del microscopio, determinando como límite superior los primeros núcleos celulares que aparecen en foco y como límite inferior del corte, los últimos que aparecen enfocados. El volumen de las áreas sometidas a estudio fue estimado usando el principio de Cavalieri, empleando el método de conteo por puntos de Weibel (1979). Como no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los distintos grupos experimentales, los cambios en el número de células inmunorreactivas por unidad de volumen con la técnica del disector óptico probablemente reflejan cambios en el número total de dichas células. Aplicamos la siguiente fórmula para conocer el número de células por milímetro cúbico a partir del número de células por campo:

$$\text{N}^{\circ}\text{células/mm}^3 = (N \times 1000) / (A \times Z) \text{ donde,}$$
$$N = \text{n}^{\circ} \text{ células/campo}$$
$$A = \text{área del campo (mm}^2\text{)}$$
$$Z = \text{grosor del corte (\mu m)}$$

- **Células IL-6R $\alpha$  y MCH inmunorreactivas**

La densidad de células inmunorreactivas para el IL-6R $\alpha$  que presentaban inmunomarcaje frente a MCH en las áreas cerebrales ZI, DA, LHA y Pe, fue estimada por el método del disector óptico. Los recuentos se realizaron en 3 cortes de 50  $\mu\text{m}$  por animal y se contaron 22 campos por corte. Los visores de recuento

empleados fueron los usados para el recuento de células inmunorreactivas frente a IL-6R $\alpha$  de las mismas áreas.

### **2.6.3 Análisis estereológico en el modelo de tratamiento crónico con leptina (*icv*)**

- **Células MHC-II inmunorreactivas**

Investigamos el efecto de la leptina *i.c.v* en la activación de las células de microglía en el hipotálamo. El número de células inmunorreactivas frente a MHC-II fue estimado por el método del disector óptico. El visor de recuento empleado fue de 130 x 130  $\mu$ m, en 6 cortes de 20  $\mu$ m por animal. Se muestrearon 30 campos por corte.

### **2.6.4 Análisis estereológico en el modelo de inflamación *in vivo***

- **Células OX-42 y MHCII inmunorreactivas**

El tratamiento con la endotoxina LPS afecta al parénquima cerebral y cerebelar, en zonas que están más cercanas a la barrera hematoencefálica y en general produce una mayor activación microglial en la sustancia blanca. Las células MHC-II y OX-42 inmunorreactivas fueron muy abundantes en la sustancia blanca de cerebelo, ambas en sustancia blanca central y en la capa molecular de la corteza cerebelar. Por tanto seleccionamos el cerebelo para el análisis morfométrico. El número células MHC-II y OX42 inmunorreactivas fue analizado en la sustancia blanca central del cerebelo en una región dorsal y anterior al núcleo lateral cerebelar, localizado entre los lóbulos 2–5 y en una distancia lateral de ~2.4–2.9 mm de la línea media, de acuerdo con el atlas esterotáxico del cerebro de la rata realizado por Paxinos y Watson (1986). El número de células fue estimado por el método del disector óptico empleando el grosor total de la sección como altura del disector (50  $\mu$ m) y un visor de recuento de 220 x 220  $\mu$ m. Se contaron 60 campos por animal.

- **Células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas**

En el cerebelo de estos animales, las células que presentaron mayor inmunorreactividad frente a IL-6R $\alpha$  fueron las neuronas de Purkinje. Se empleó el disector óptico para realizar los recuentos en la capa de células de Purkinje de los lóbulos 5 – 7 y un visor de recuento de 125 x 105  $\mu$ m. Se contaron 22 campos por animal.

- **Células OX-42 inmunorreactivas que presentan el ER $\alpha$**

Para cada animal, el porcentaje de células inmunorreactivas OX-42 que presentaban inmunomarcaje frente a ER $\alpha$  en la sustancia blanca central del cerebelo fue estimada en microfotografías de un área total de 0.1 mm<sup>2</sup>. Empleamos secciones inmunomarcadas frente al ER $\alpha$  y OX-42 (canales verde y rojo respectivamente) que fueron fotografiados con el objetivo 40X en un microscopio Leica DMI 6000B. Los puntos de colocalización de los canales rojo y verde fueron identificados en imágenes RGB con la ayuda del programa Image J (National Institute of Health, USA) utilizando la aplicación de colocalización. Los puntos de colocalización identificados por el programa Image J fueron confirmados por inspección visual de las imágenes. En cada imagen, para estimar el porcentaje de somas celulares en los que colocalizaban OX-42 y ER $\alpha$ , se contaron el número de somas inmunorreactivos frente a OX-42 que presentaban puntos de inmunorreactividad frente a ER $\alpha$  y el número total de somas inmunorreactivas frente a OX-42.

## **2.7 Obtención de proteínas**

### **2.7.1 Tejido**

La disección del hipotálamo se realizó mediante cortes alrededor de su contorno, e inmediatamente después, el tejido se homogenizó en un tampón de lisis adecuado para el posterior análisis por Western blotting: Tampón fosfato sódico 0,1M; pH 7,4, Triton X-100 1%, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1%, azida sódica 0,5%, EDTA 2mM, deoxicolato sódico 0,5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y una pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, GMBH) por cada 7 ml de tampón de lisis.

Cada uno de los tejidos se sumergió en 500  $\mu$ l de dicho tampón y con ayuda de un potter se homogenizó en frío. El homogenizado se mantuvo durante 1 hora en hielo y posteriormente se centrifugó a 35060 g durante 20 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante y congelándose a -80 °C hasta su utilización. La concentración de proteínas totales fue evaluada mediante el método de Bradford (1976). Brevemente, cada muestra diluida en agua se mezcló con el reactivo concentrado (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante.



La mezcla se agitó y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, midiendo después su absorbancia a 595 nm con un espectofotómetro Infinite M200 (TECAN, Salzburgo, Austria). La recta patrón se realizó con 0-25 µg de BSA.

### **2.7.2 Línea celular BV-2**

Tras los correspondientes tratamientos, las células fueron levantadas mediante un suave raspado de la placa P60, se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadió tampón fosfato salino (PBS), de nuevo fueron centrifugadas y se añadieron 50 µl de un tampón de lisis: Hepes 25 mM, pH 8-9, KCl 150 mM, EDTA 2mM, Igepal 0,1%, PMSF 1mM, Benzamidina 10 µM, Leupeptina 10 µM, DTT 0,5 mM y Agua destilada.

El pellet de células fue totalmente resuspendido, antes de congelar el lisado celular a -80°C durante una noche. A continuación, los extractos fueron desnaturalizados siguiendo 3 ciclos de choques térmicos en N<sub>2</sub> líquido y un baño a 37 °C. Posteriormente se centrifugó a 35060 g durante 15 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante y realizamos la estimación del contenido de proteínas mediante el ensayo de Bradford.

## **2.8 Electroforesis y Western blotting**

Esta técnica nos permite separar las distintas proteínas de una mezcla compleja (homogenizado de tejido o de una línea celular) en función de su peso molecular. Esto se consigue aplicando un campo eléctrico que obliga a las proteínas a moverse a través de un polímero poroso (gel de acrilamida/bisacrilamida). La electroforesis se realizó siempre en condiciones desnaturalizantes, esto es en presencia de altas concentraciones de detergente y de un agente reductor. Tras su separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF), donde una vez inmovilizadas, se procedió a su marcaje utilizando anticuerpos específicos.

Se empleó un equipo de electroforesis para geles de pequeño tamaño (Bio-Rad) y un tampón de electroforesis de tris-glicina (Tris 0,025 M pH 8,3; glicina 0,192 M; SDS 0,1%). Las alícuotas de proteína (60 µg para muestras obtenidas de tejido, 15 y 60 µg para aquellas procedentes de líneas celulares), se mezclaron con tampón Laemmli 2x (conteniendo Tris-HCl 1 M pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2% y azul de bromofenol

0.01%) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100 °C. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que determina el tamaño del poro, se ajustó al peso molecular de la proteína que se fuera a detectar en cada caso. Junto a las muestras se cargó un marcador de peso molecular de rango amplio (10-250 KDa, Bio-Rad). Tras su separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo en un equipo de transferencia sumergida (Bio-Rad). La membrana se lavó brevemente con agua destilada y se hizo una tinción general de proteínas con rojo Ponceu para realizar las correcciones de la carga en los pocillos, a continuación, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente, utilizando una solución de leche desnatada en polvo o BSA al 5% en Tampón de Tris-HCl salino con Tween-20 (TTBS; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 0,1M, Tween-20 0,1%, Sigma). Se empleó el bloqueo con BSA para anticuerpos frente a proteínas fosforiladas y anticuerpos que presentaban mayor inespecificidad.

La incubación con la mezcla del anticuerpo primario en TTBS suplementado con leche o BSA (ambos al 5%) se realizó durante 24h a 4°C en agitación. Se utilizaron los anticuerpos detallados en la Tabla 2 a las diluciones indicadas.

**TABLA 2. ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS EN WESTERN BLOTTING**

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA
<b>COX-2</b>	Conejo	1:1000	160116; CAYMAN CHEMICAL
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Ratón	1:500	ALX-803-004; ALEXIS BIOCHEMICALS, CA, EEUU
<b>ER<math>\beta</math></b>	Conejo	1:500	ALX-210-132; ALEXIS BIOCHEMICALS, CA, EEUU
<b>IL-6</b>	Conejo	1:500	500-P73; PEPROTECH
<b>IL-6Ra (M-20)</b>	Conejo	1:500	Sc-660; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
<b>SOCS-3</b>	Conejo	1:1000	2923; CELL SIGNALING
<b>PCNA</b>	Ratón	1:1000	Sc-56; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
<b>P-I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math> (Ser32) I</b>	Conejo	1:1000	9241L; CELL SIGNALING

## **2.9 Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y PCR cuantitativa en tiempo real**

La extracción de ARN de las células BV2 se realizó a partir de placas P60, sembradas a una densidad celular de 50.000 células/cm<sup>2</sup>. Tras los tratamientos, levantamos las células, realizamos el lavado con PBS y centrifugamos como se ha detallado en el apartado anterior. Una vez obtenido el pellet de células, se resuspendió totalmente en 500 µl de reactivo TRIzol® (15596-018; Invitrogen, Nueva Zelanda) y a continuación realizamos la extracción de ARN según el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El ARN obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría de alta sensibilidad (Nanodrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos). La retranscripción se realizó en un termociclador (Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad) y se empleó un kit que incluía la enzima MuLV transcriptasa reversa, inhibidor de RNasas, hexámeros de nucleótidos y desoxinucleótidos fosfato (dNTPs) (4368814; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Retrotranscribimos 4µg de ARN, el protocolo fue el siguiente: el ARN se mantuvo a 70°C durante 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias. Durante esta fase, el ARN fue incubado con una mezcla de hexámeros de nucleótidos (Random Primers, Gibco Life Technologies Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), empleados como cebadores para el inicio de la RT. Seguidamente, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 1 hora con la solución de RT que incluía la retrotranscriptasa y los desoxinucleótidos fosfato. Finalmente, las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 70°C para inactivar a la enzima retrotranscriptasa. Las PCRs a tiempo real fueron realizadas en un termociclador (ABI Prism 7500 Thermal Cycler, Applied Biosystems), en placas de 96 pocillos. Para cada reacción se tomaron 5µl del producto de RT (cDNA), previa dilución 1:2 para el análisis del gen de la IL-6 y para el gen control 18s tomamos 5 µl de una dilución 1:100 que procedía de una dilución previa 1:4 del cDNA en agua destilada. A continuación, se añadió un volumen de 15 µl que contenía los oligonucleótidos cebadores correspondientes a una concentración de 10 µM (Tabla 3) junto con la mezcla de reacción (SYBR GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems). Cada muestra fue amplificada por duplicado. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo durante 40 ciclos con una primera etapa a 95°C durante 15 segundos para desnaturalizar el ADN. A esta etapa le siguió una segunda a 60°C durante 1 minuto para el anillamiento y elongación de los oligonucleótidos cebadores. Para detectar la

presencia de posibles contaminaciones externas con ADN genómico, en cada PCR se incluyeron controles sin el producto de RT, conteniendo en su lugar agua destilada. Después de la amplificación, se desarrolló una curva de desnaturalización, para asegurar la presencia de un único producto de amplificación. Para normalizar los valores de expresión de cada gen con respecto al contenido total de cDNA, los valores fueron comparados con los de la molécula de 18S ribosomal, empleada como control interno (Thellin y cols., 1999). El análisis de los datos de expresión génica relativa se realizó comparando los valores  $\Delta Ct$  con respecto al control interno del experimento y el gen control 18S, obteniendo los resultados calculando el logaritmo en base 2  $^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### **2.9.1 Oligonucleótidos cebadores empleados**

La secuencia del transcrito de IL-6 analizado se obtuvo a partir de la búsqueda en la base de datos de secuencias génicas NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Dentro de cada secuencia se seleccionaron las regiones más idóneas para su amplificación. Para el diseño de los oligonucleótidos se empleó el programa informático Primer Express (Applied Biosystems). Este programa permite estimar los parámetros básicos de los oligonucleótidos, como son su temperatura de disociación ( $T_m$ ), porcentaje de guaninas-citosinas (%GCs) y el riesgo de formar dímeros de oligonucleótidos. Como características generales, los oligonucleótidos se caracterizaron por poseer una longitud de entre 18-25 bases, un porcentaje de GCs superior al 40% y una  $T_m$  en torno a 60 °C (ver Tabla 3). Para determinar la idoneidad de cada pareja de oligonucleótidos se realizó un ensayo con el programa informático Amplify (Universidad de Wisconsin-Madison). Este programa permite realizar una PCR virtual con los oligonucleótidos seleccionados imitando las condiciones de una PCR real. Con los datos de esta PCR virtual se puede estimar la eficiencia aproximada que tendría la PCR real, permitiendo así seleccionar de forma óptima los oligonucleótidos cebadores. Para asegurar la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos, se realizó una secuenciación del producto de PCR amplificado. Para ello, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. La banda de PCR fue purificada con un kit de purificación de productos de PCR (QIAquick PCR purification Kit, Qiagen) y secuenciada posteriormente (Servicio de Secuenciación Automática de ADN, Secugen SL, Madrid, España).

**TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES**

IL-6 Y 18S			
TRÁNSCRITO REF. GEN- BANK	OLIGONUCLEÓTIDO CEBADOR EN SENTIDO 5'-3'	OLIGONUCLEÓTIDO CEBADOR EN SENTIDO 3'-5'	T <sub>m</sub>
18S NR_003286	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'	5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG-3'	60
IL-6	5'-GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG-3'	5'-TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'	60

## 2.10 Técnica ELISA para la determinación de la leptina sérica

La cuantificación de los niveles séricos de leptina se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (EZRL-83K; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Brevemente, se añadió tampón de ensayo a los pocillos de placas de poliestireno y a continuación se añadieron las muestras, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución antiséptica, después se realizaron varios lavados. Se añadió la solución con el anticuerpo frente a leptina de ratón biotinilado, manteniéndolo en incubación 1 hora a temperatura ambiente, seguido de los lavados. A continuación se agregó la solución con la estreptavidina conjugada con peroxidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente y de nuevo se lavó la placa. Por último, se añadió el sustrato de la peroxidasa y se detuvo la reacción con ácido cuando la absorbancia de las muestras alcanzó las 1.2 unidades de densidad óptica al medirla a 370 nm. La lectura de los resultados fue realizada con un espectrofotómetro Tecan Infinite M200 (Grödig, Austria) a 450 nm y 590 nm. La sensibilidad de este método fue de 0,04 ng/ml, con unos coeficientes intra- e inter-ensayo de 2,2% y 3,4%, respectivamente.

## 3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Hemos empleado en este trabajo análisis estadísticos basados en la comparación de medias con datos no pareados. Para todas las pruebas empleamos el paquete estadístico GraphPad Prism versión 4.01. Se aplicaron pruebas paramétricas a las muestras que cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad (igualdad de varianzas). El nivel de significación estadística se estableció siempre en valores de  $p$  menores de 0,05. La igualdad de varianzas se determinó con un valor de estadístico de Levene que ofreciera una  $p > 0,05$ . Para varianzas homogéneas se procedió de la siguiente manera: Los experimentos que comparaban sólo 2 tratamientos, se analizaron

con la prueba T de Student. Los experimentos que incluían más de 2 grupos experimentales fueron analizados con el test de ANOVA de una vía. En caso de que resultara significativa la prueba, se detallaron las diferencias entre parejas de muestras con comparaciones *post hoc*, mediante el test de Tukey y Bonferroni. En casos particulares, al comparar dos variables, como el efecto del LPS y el tratamiento hormonal, empleamos una ANOVA de dos vías, obteniendo el nivel de interacción entre las dos variables. Si la interacción resultaba negativa, se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía para cada una de las variables.

Los datos se expresan en todos los casos como el valor de la media. Las barras de error representan el error estándar de la media. La *n* utilizada para los análisis estadísticos fueron los animales incluidos en los estudios *in vivo* y el número de replicas realizadas en los experimentos independientes en los estudios *in vitro*, utilizando el valor de la media de las réplicas dentro de cada experimento en la estadística.

## **RESULTADOS**

## **1. MODELO DE SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL**

Dado que la obesidad esta considerada como una situación de inflamación crónica, en este estudio nos propusimos determinar la implicación del exceso de peso en el estado de inflamación microglial y en la modulación de los niveles centrales de IL-6 y del IL-6R $\alpha$ .

### **1.1 Efecto de la sobrenutrición postnatal en el incremento de peso de ratas macho**

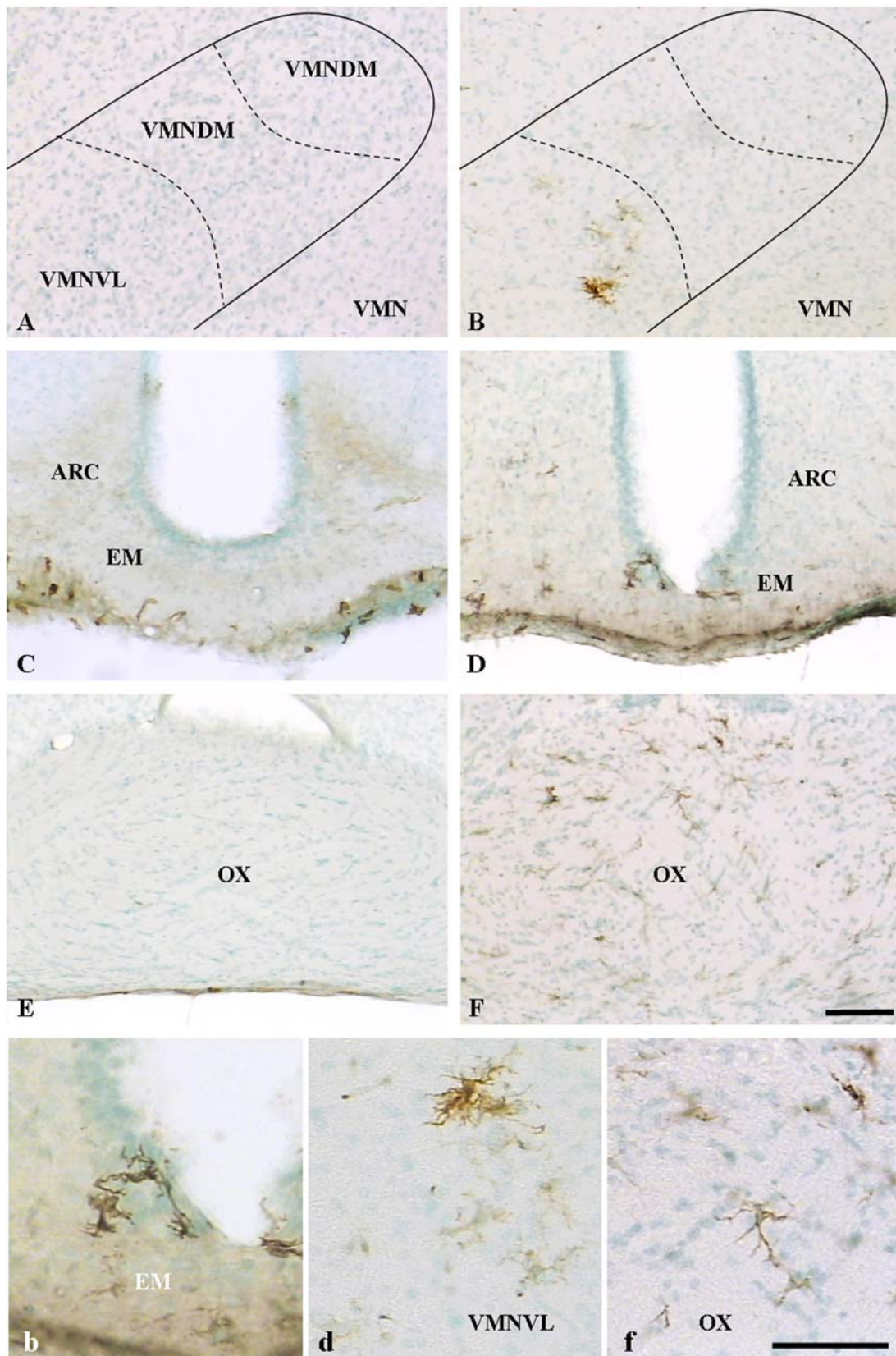
El grupo de 4 crías por camada a los 15 días de edad mostró un peso significativamente mayor ( $44 \pm 0,6$  g,  $n=9$ ) comparado con el grupo control de 12 crías ( $26 \pm 0,5$  g,  $n=12$ ,  $p<0,001$ ). A los dos meses de edad las ratas del grupo de 4 crías continuaron mostrando un peso significativamente mayor ( $289 \pm 6,9$  g,  $n=7$ ) con respecto al grupo de ratas control ( $250 \pm 4,7$  g,  $n=7$ ,  $p<0,01$ ).

### **1.2 Efectos del sobrepeso en las células de microglía**

#### **1.2.1 Microglía inmunorreactiva para el MHC-II en el hipotálamo**

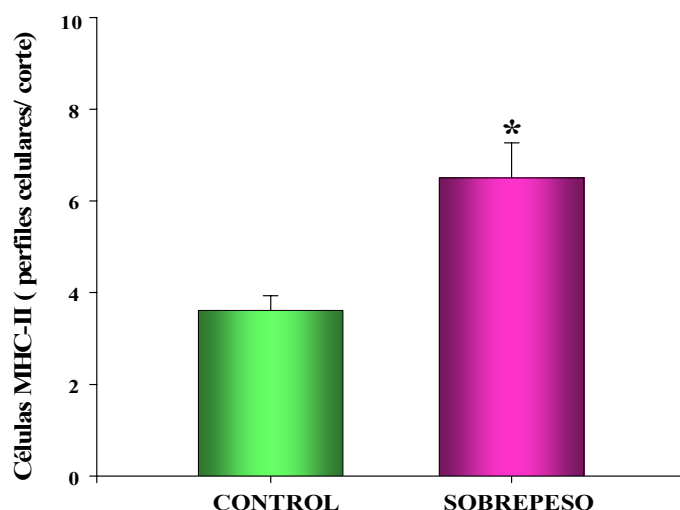
La inspección cualitativa de las secciones procesadas para la detección inmunohistoquímica del MHC-II, mostró que el inmunomarcaje estaba presente principalmente en la sustancia blanca del parénquima cerebral. En el hipotálamo, se detectaron pocas células MHC-II inmunorreactivas en las ratas control, con un incremento evidente en la densidad de las células inmunorreactivas para MHC-II en las ratas con sobrepeso. Localizamos estas células en varios núcleos del hipotálamo: PVN, VMN, DMN y Arc, y además, en el OX y la EM. En todas estas regiones encontramos en general, dos fenotipos distintos de células MHC-II inmunorreactivas; aquellas células que presentaron mayor inmunorreactividad, mostrando somas alargados y procesos más gruesos y retraídos, que fueron localizadas en la EM, OX y VMN y en la zona periventricular y aquellas células que presentaban procesos celulares más finos y largos y somas celulares más pequeños, aparecían en el PVN, VMN, DMN y Arc. En la EM, además de encontrar células de morfología típicamente reactiva, encontramos algunas células, de morfología diferente a los fenotipos anteriormente descritos, de somas esféricos, con escasas proyecciones, gruesas y muy cortas (Fig. 16).





**Fig. 16.** Inmunorreactividad frente a MHC-II en el VMN, Arc, EM y OX del hipotálamo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C y E) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D, F, b, d y f). Las imágenes b, d y f, muestran en detalle algunas células MHC-II inmunorreactivas de EM, VMN y OX, respectivamente. Arc, núcleo arcuato. EM, eminencia media. OX, quiasma óptico. VMN, núcleo ventromedial, VMNDM, parte dorsomedial. VMNC, parte central. VMNVL, parte ventrolateral. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m. Escala de las figuras de células MHC-II inmunorreactivas a gran aumento (70  $\mu$ m).

Cuantificamos el número de células de microglía reactiva en el hipotálamo, incluyendo el PVN, VMH, DMN y Arc, observando un incremento significativo del número de perfiles celulares MHC-II inmunorreactivos en el hipotálamo de las ratas con sobrepeso (Fig. 17).



**Fig. 17.** Perfiles celulares inmunorreactivos para MHC-II/corte en el hipotálamo (PVN, DMN, VMN y Arc) de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Ratas con normopeso (CONTROL, n=6); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

Analizamos de forma aislada varios núcleos del hipotálamo. En el PVN no encontramos diferencias significativas en el número de perfiles celulares MHC-II inmunorreactivos comparando ambos grupos (Fig. 18).

Los núcleos DMN y Arc de las ratas con sobrepeso mostraron un incremento del número de células MHC-II inmunorreactivas, pero no fue significativamente diferente de los valores control (Figs. 16 y 18).

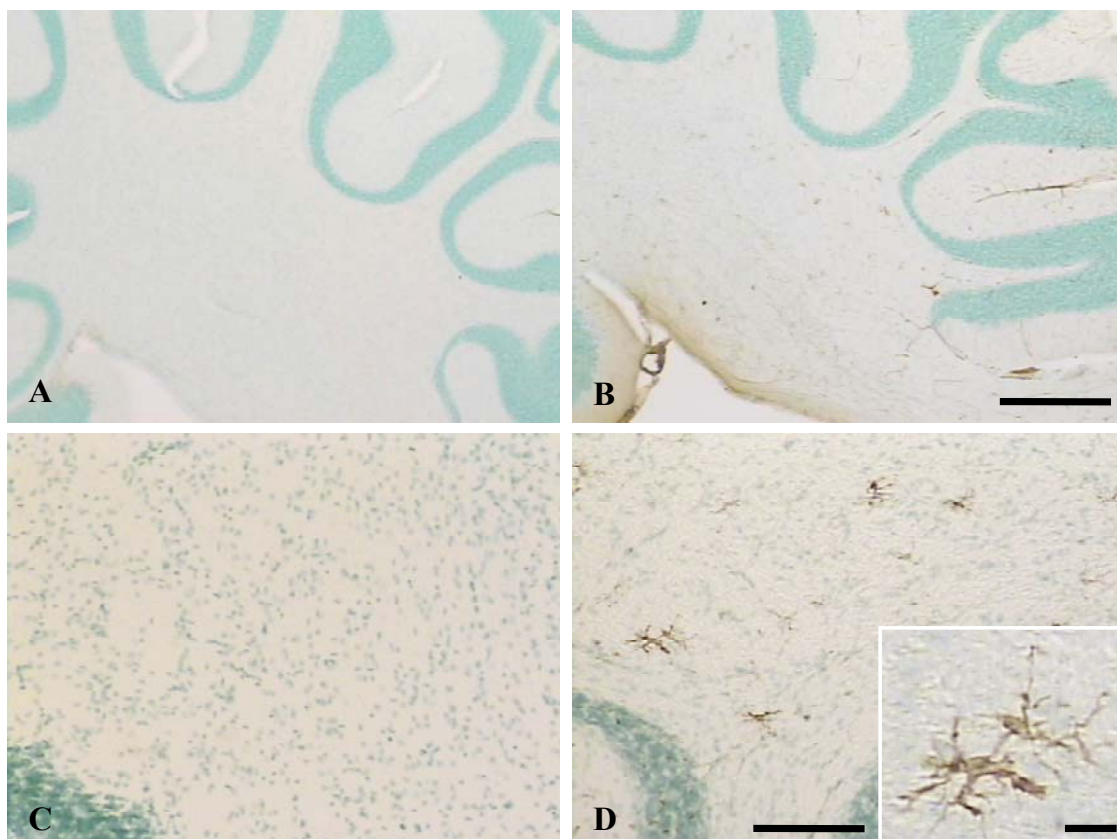
En el VMN, OX y EM, las ratas con sobrepeso presentaron un aumento significativo del número de células MHC-II inmunorreactivas comparado con las ratas control (Figs. 16 y 18).

ÁREAS CEREBRALES		$\bar{X} \pm SEM$		P
		CONTROL	SOBREPESO	
QUIASMA ÓPTICO		1 $\pm$ 0,3	31 $\pm$ 11	0,05
HIPOTÁLAMO	N. PARAVENTRICULAR	4 $\pm$ 0,8	5 $\pm$ 0,9	0,49
	N. VENTROMEDIAL	4 $\pm$ 0,5	8 $\pm$ 0,9	0,005
	N. DORSOMEDIAL	4 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	0,09
	N. ARCUATO	3 $\pm$ 0,4	5 $\pm$ 1	0,07
	EMINENCIA MEDIA	4 $\pm$ 1	14 $\pm$ 3	0,02

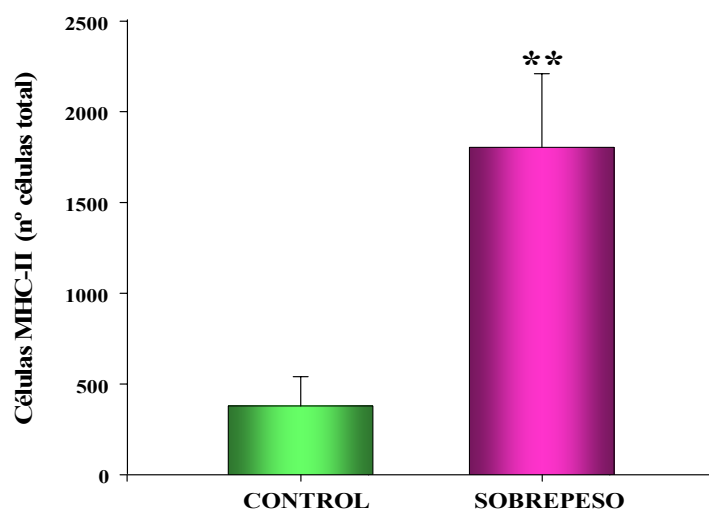
Fig. 18. Tabla resumen de los perfiles celulares inmunorreactivos para MHC-II/corte en el PVN, VMN, DMN, Arc, EM y OX de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Ratas con normopeso (CONTROL, n=6); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. P, valor de la P estadística; **P en verde**, diferencias significativas versus valores CONTROL.

### 1.2.2 Microglía inmunorreactiva para el MHC-II en el cerebelo

Las ratas con sobrepeso mostraron una densidad de células MHC-II inmunorreactivas más elevada a lo largo de todo el cerebelo en comparación con las ratas control. Ambos grupos mostraron el mismo fenotipo celular, con somas alargados y procesos finos, pero no retraídos (Fig. 19). El análisis cuantitativo confirmó las observaciones cualitativas anteriores. Las ratas con sobrepeso mostraron un aumento significativo de las células MHC-II inmunorreactivas en comparación con las ratas control (379 $\pm$  161 vs 1803 $\pm$ 407 células totales en la sustancia blanca del cerebelo, en el grupo control y con sobrepeso respectivamente,  $p<0,01$ ) (Fig. 20).



**Fig. 19.** Inmunorreactividad frente a MHC-II en la sustancia blanca de cerebelo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A y C) y del grupo de ratas con sobrepeso (B y D). El inserto en la figura D muestra en detalle la morfología de las células MHC-II inmunorreactivas. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m. Escala del inserto 20  $\mu$ m.



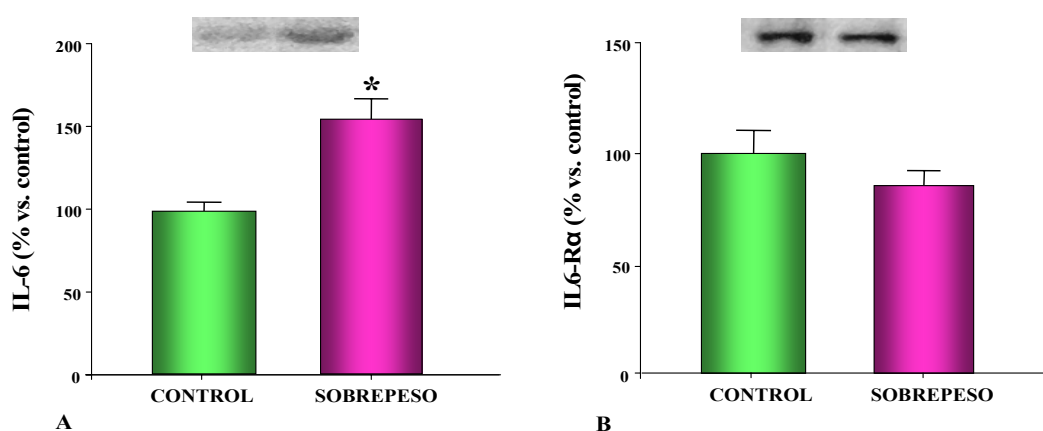
**Fig. 20.** Células inmunorreactivas para MHC-II totales en la sustancia blanca de cerebelo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Ratas con normopeso (CONTROL, n=6); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=6). Los datos mostrados son el valor absoluto  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.3 Efectos del sobrepeso sobre la IL-6 y el IL-6R $\alpha$

Decidimos estudiar si los niveles centrales y la distribución de la IL-6 y su receptor, podrían estar modificados en los animales con sobrepeso.

#### 1.3.1 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ en el hipotálamo

Los niveles de la IL-6 estaban incrementados significativamente en el hipotálamo de las ratas con sobrepeso ( $p < 0,05$ ) comparados con las ratas control, sin embargo no se detectaron cambios a nivel del receptor (Fig. 21 A y B).



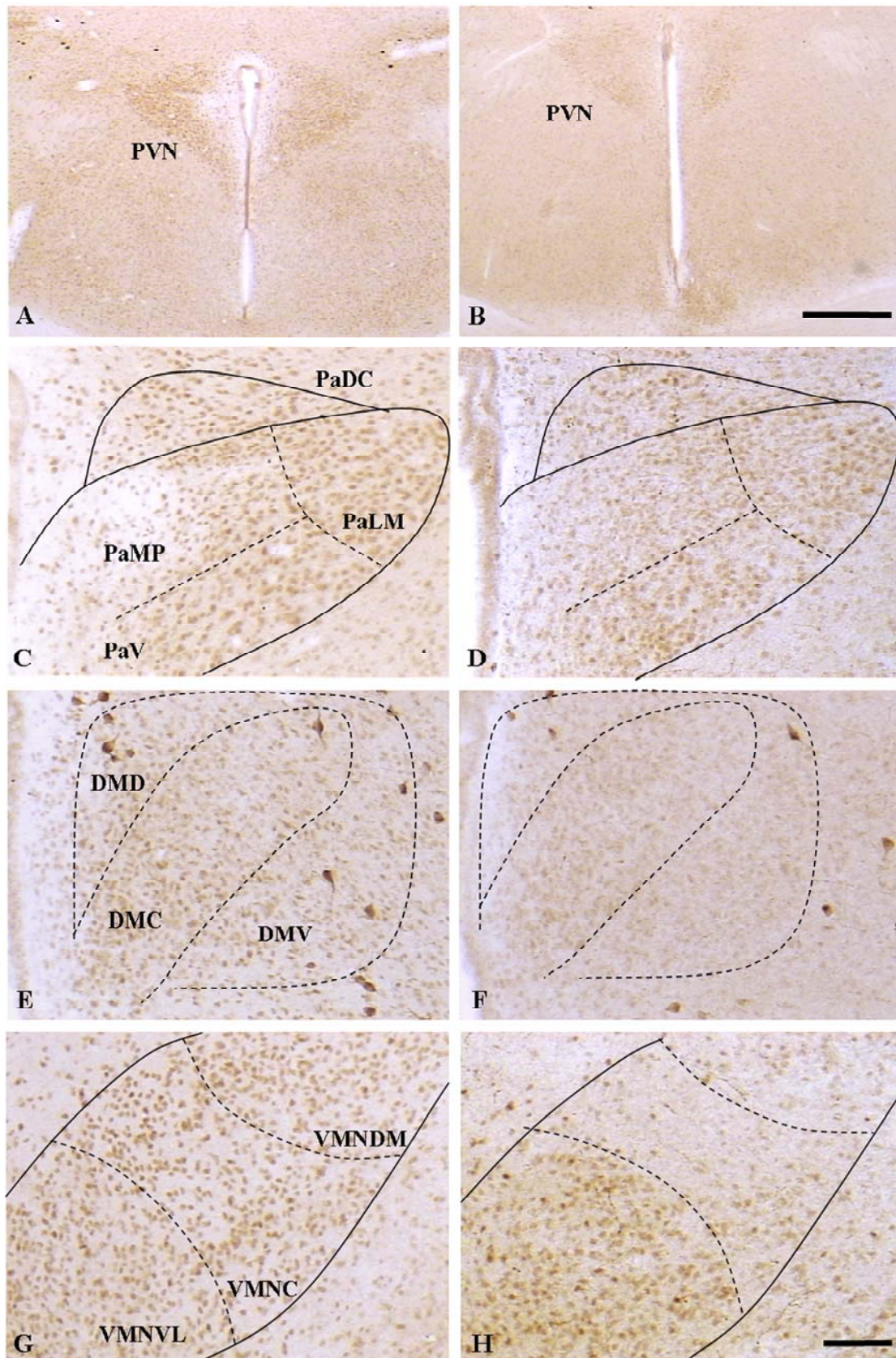
**Fig. 21.** Niveles relativos de la IL-6 (A) y del IL-6R $\alpha$  (B) medidos por Western blotting en el hipotálamo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas con sobrepeso. Ratas con normopeso (CONTROL,  $n=4$ ); ratas con sobrepeso (SOBREPESO,  $n=4$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

#### 1.3.2 Distribución del IL-6R $\alpha$ en el hipotálamo

En el hipotálamo, en condiciones basales, encontramos inmunomarcaje en algunos órganos circunventriculares como MPOA y EM, y en áreas hipotalámicas como el núcleo supraquiasmático (Sch), SO, PVN, VMN, DMN, Pe, Arc, DA y LHA, y en la región cerebral ZI. El marcaje frente a IL-6R $\alpha$  se localizó principalmente en neuronas y con menos frecuencia en células de glía, en el soma celular y, con una distribución puntiforme, en algunas de las proyecciones y terminales neuronales. Las observaciones cualitativas revelaron cambios en la distribución del IL-6R $\alpha$  y en la intensidad del inmunomarcaje. En las ratas con sobrepeso, con respecto al estado basal, observamos en general un marcaje más difuso y de intensidad menor en las diferentes áreas estudiadas.

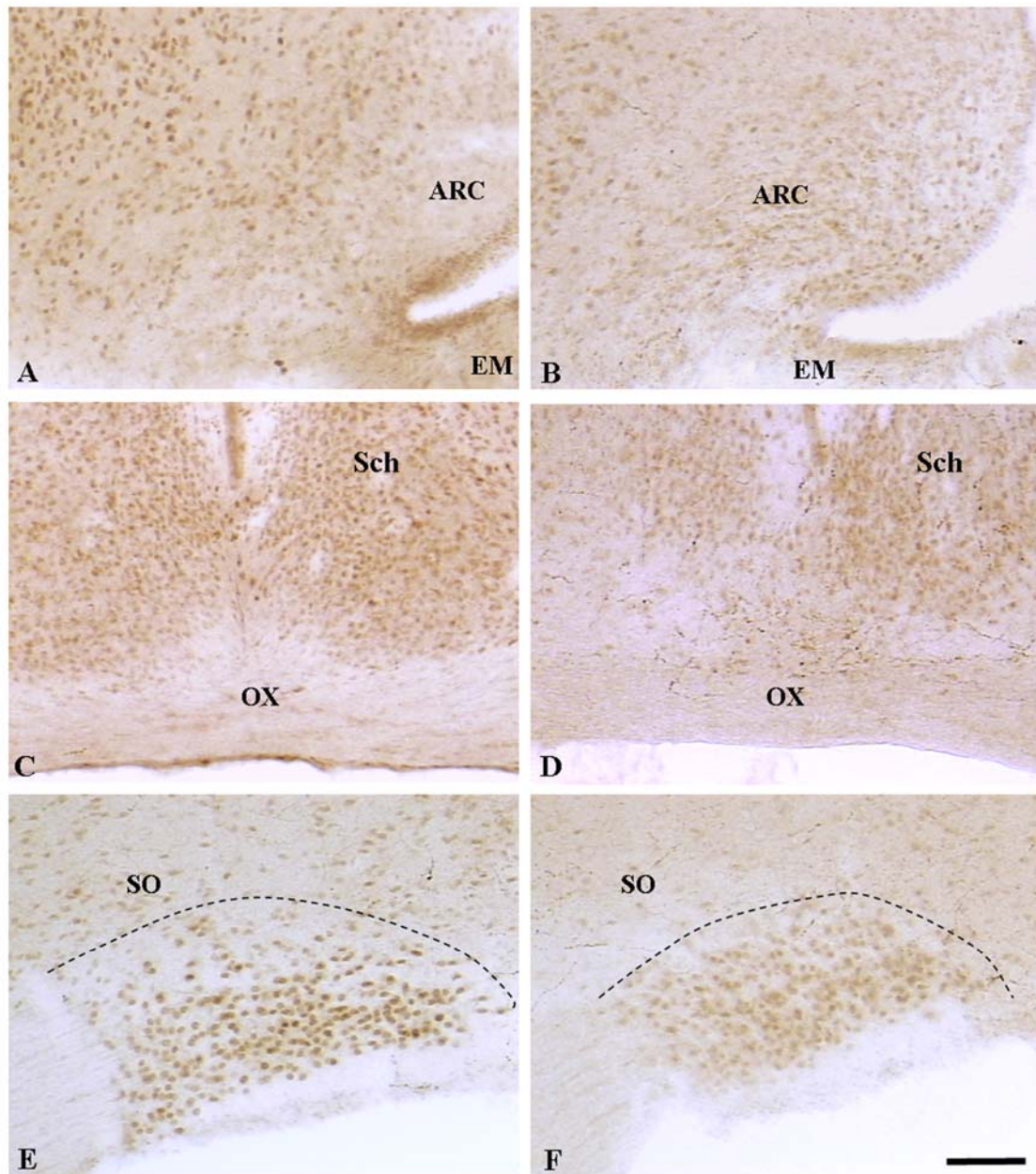
Observamos una disminución en la densidad de neuronas y cambios en la distribución de IL-6R $\alpha$ . en ZI, DA, LHA y Pe (Fig. 22-24).





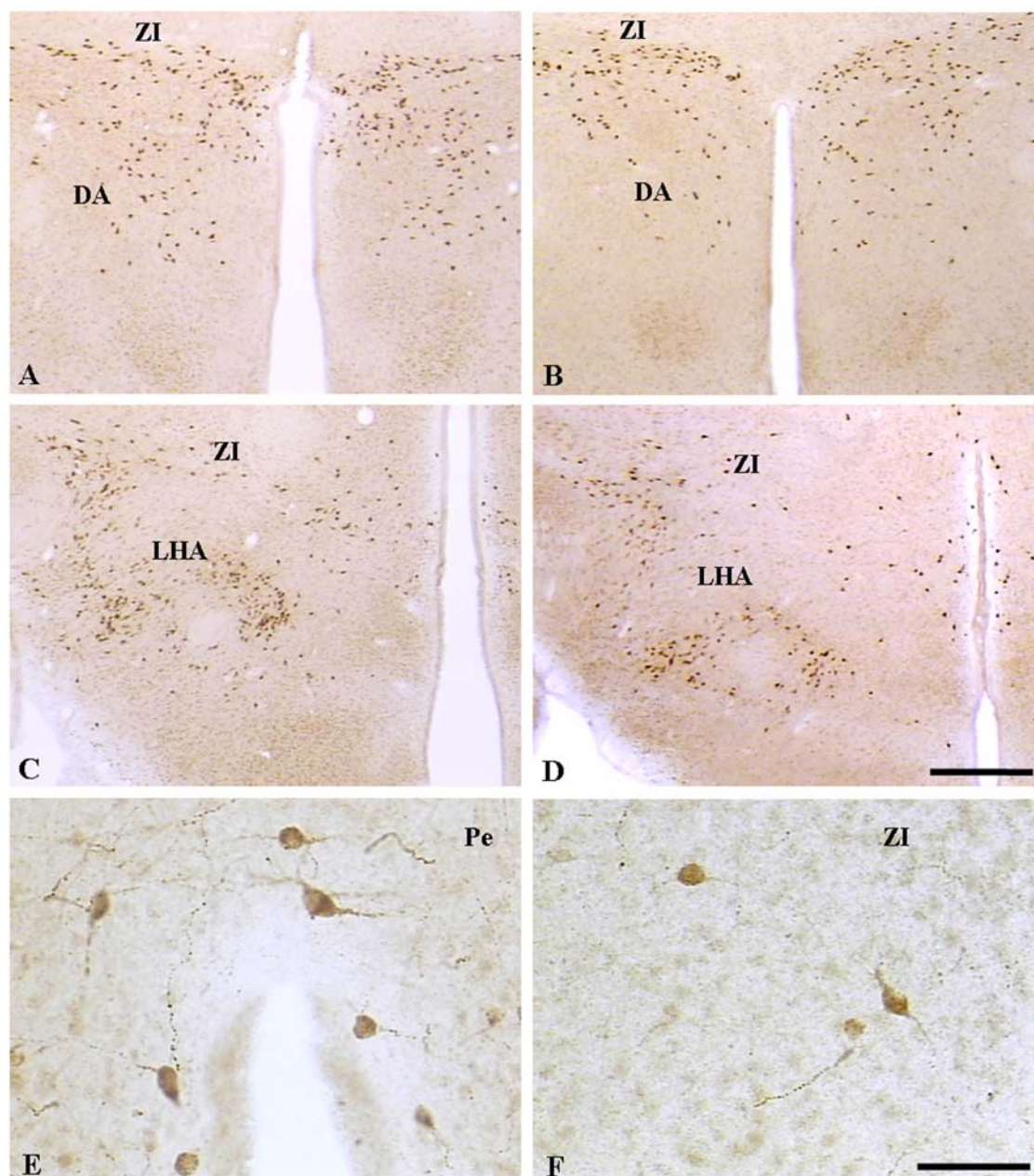
**Fig. 22.** Inmunorreactividad frente a IL-6Ra en el PVN (C y D), DMN (E y F), VMN (G y H) del hipotálamo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C, E y G) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D, F y H). Las figuras A y B muestran una imagen panorámica del PVN. PVN: PaDC, cápsula dorsal. PaLM, parte magnocelular lateral. PaMP, parte parvicelular medial. PaV, Parte ventral. DMN: DMC, parte compacta. DMD, parte dorsal. DMV, parte ventral. VMN: VMNDM, parte dorsomedial. VMNC, parte central. VMNVL, parte ventrolateral. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m. Escala de las figuras panorámicas 500  $\mu$ m.





**Fig. 23.** Inmunorreactividad frente a IL-6Ra en el Arc y EM (A y B), OX (C y D), SO (E y F) de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C y E) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D y F). Arc, núcleo arcuato. EM, eminencia media. OX, quiasma óptico. Sch, núcleo supraquiasmático SO, núcleo supraóptico. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m.





**Fig. 24.** Inmunorreactividad frente a IL-6R $\alpha$  en la ZI, DA (A y B) y LHA (C y D) de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C y E) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D y F). Las figuras E y F muestran a gran aumento detalles de la morfología de algunas células IL-6 R $\alpha$  inmunorreactivas en la región periventricular y en la zona incerta. DA, área hipotalámica dorsal. LHA, área hipotalámica lateral. Pe, zona periventricular. ZI, zona incerta. Escala de las imágenes: 500  $\mu$ m, en A-D y 70  $\mu$ m en E y F.

Realizamos el análisis estereológico, empleando el disector óptico, en ZI, DA, LHA y Pe, y comprobamos que en el área hipotalámica dorsal, las ratas con sobrepeso experimentaron un descenso significativo del número de células inmunorreactivas para IL-6R $\alpha$  comparado con el estado basal (DA; control:  $2052 \pm 231$ ; sobrepeso:  $456 \pm 27$ ;  $p < 0,01$  versus control) (Fig. 25). En el resto de las áreas analizadas; ZI, LHA y Pe, no encontramos diferencias significativas en el número de células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas con respecto a las ratas control (LHA; control:  $8199 \pm 619$ ; sobrepeso:  $9015 \pm 84$ ; ZI;

control:  $2797 \pm 284$ ; sobrepeso:  $2831 \pm 407$ ; Pe; control:  $1025 \pm 142$ ; sobrepeso:  $1117 \pm 77$ . Los datos mostrados son células/mm<sup>3</sup> (Fig. 25).

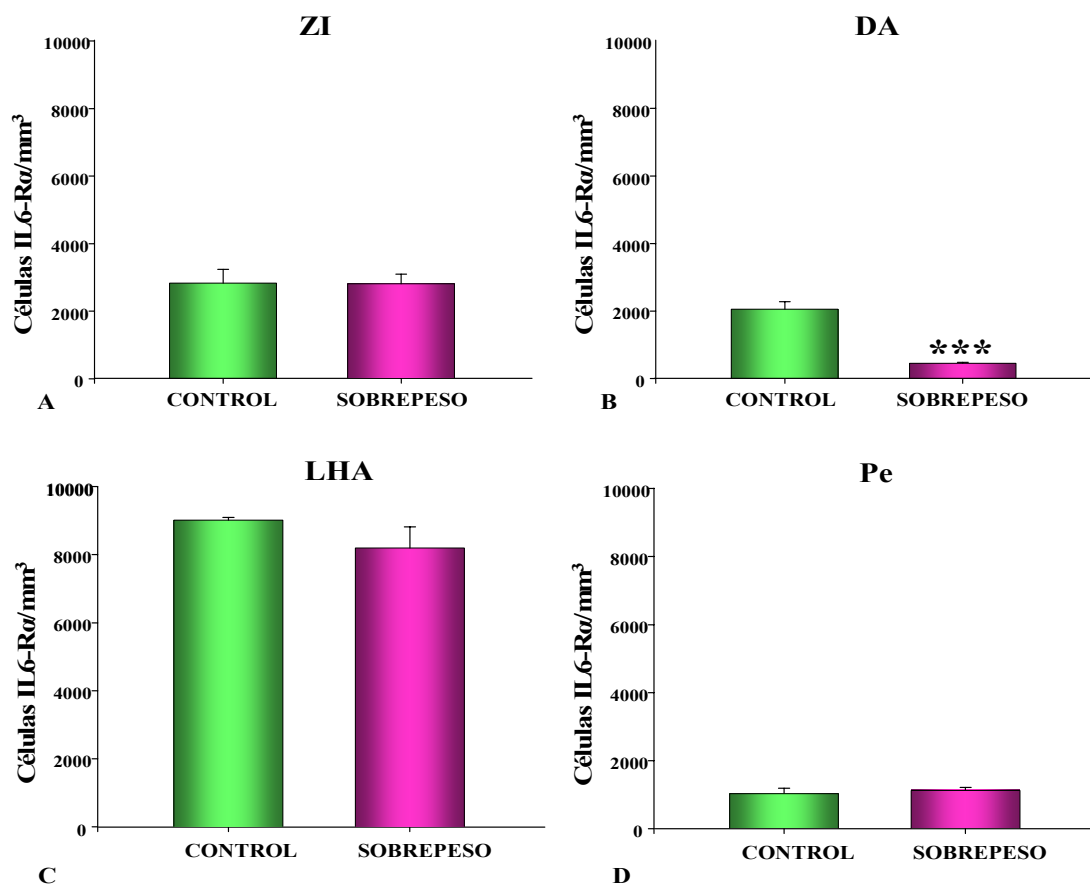
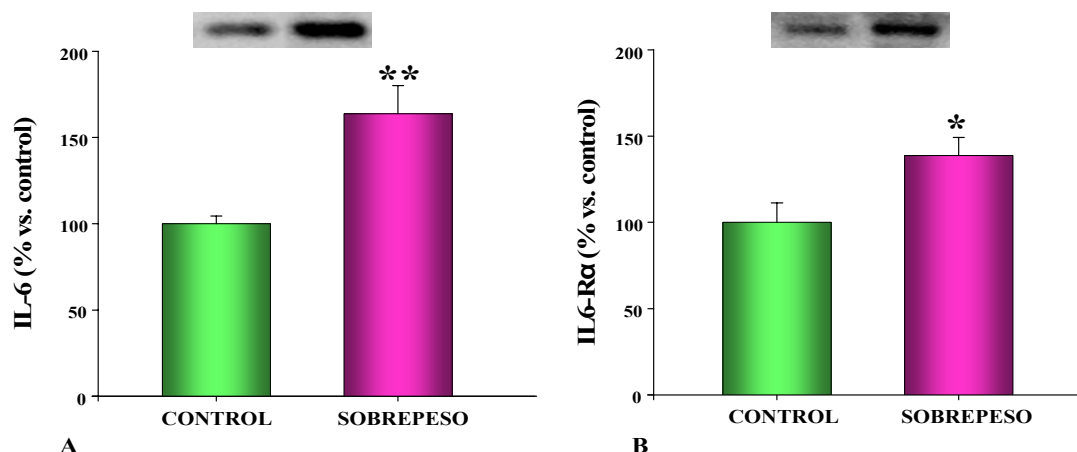


Fig. 25. Células inmunorreactivas para MHC-II/mm<sup>3</sup> en ZI (A), DA (B), LHA (C) y Pe (D) del hipotálamo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Ratas con normopeso (CONTROL, n=6); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 1.3.3 Niveles de la IL-6 y del IL-6Rα en el cerebelo

Los niveles de la IL-6 y del IL-6Rα estaban incrementados significativamente en el cerebelo de las ratas con sobrepeso ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) comparados con las ratas control (Fig. 26A y B).



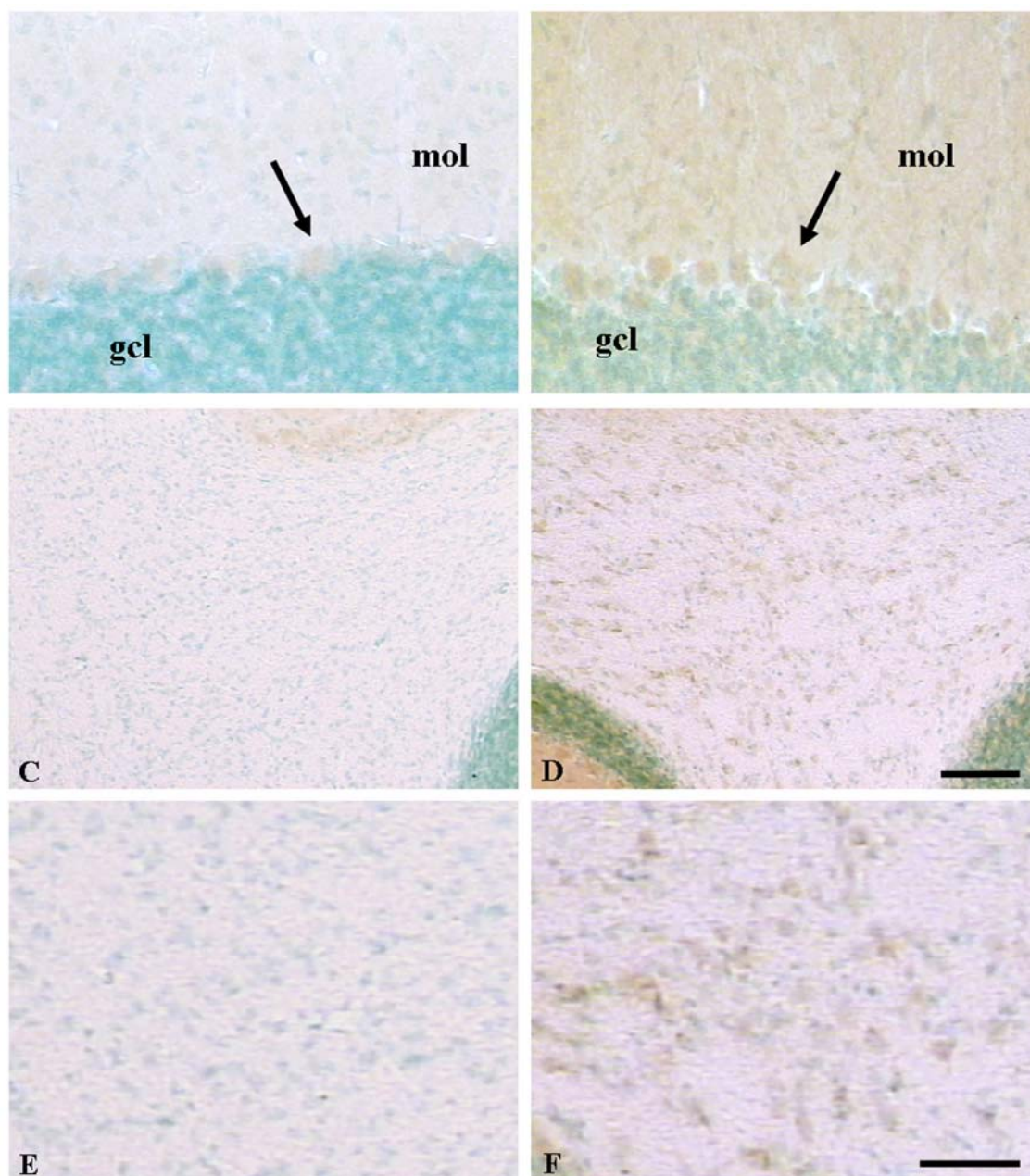
**Fig. 26.** Niveles relativos de la IL-6 (A) y del IL-6Ra (B) medidos por Western blotting en el cerebelo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas con sobrepeso. Ratas con normopeso (CONTROL, n=4); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=4). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.3.4 Distribución de la IL-6 en el cerebelo

En el cerebelo de las ratas control el inmunomarcage de la IL-6 fue débil y estaba presente únicamente en el soma de algunas neuronas de Purkinje (Fig. 27). En las ratas con sobrepeso, encontramos una elevada inmunorreactividad frente a la IL-6, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris, en contraste con las ratas control (Fig. 27).

Observamos que las células gliales de la sustancia blanca presentaban inmunorreactividad en el citoplasma perinuclear, perfilando los núcleos y fue menos evidente en los procesos de las células de glía. La mayoría de las células de Purkinje eran inmunorreactivas frente a la IL-6, a diferencia de las ratas control. La inmunorreactividad observada en las células de Purkinje fue muy intensa en el soma y más débil en el árbol dendrítico (Fig. 27).



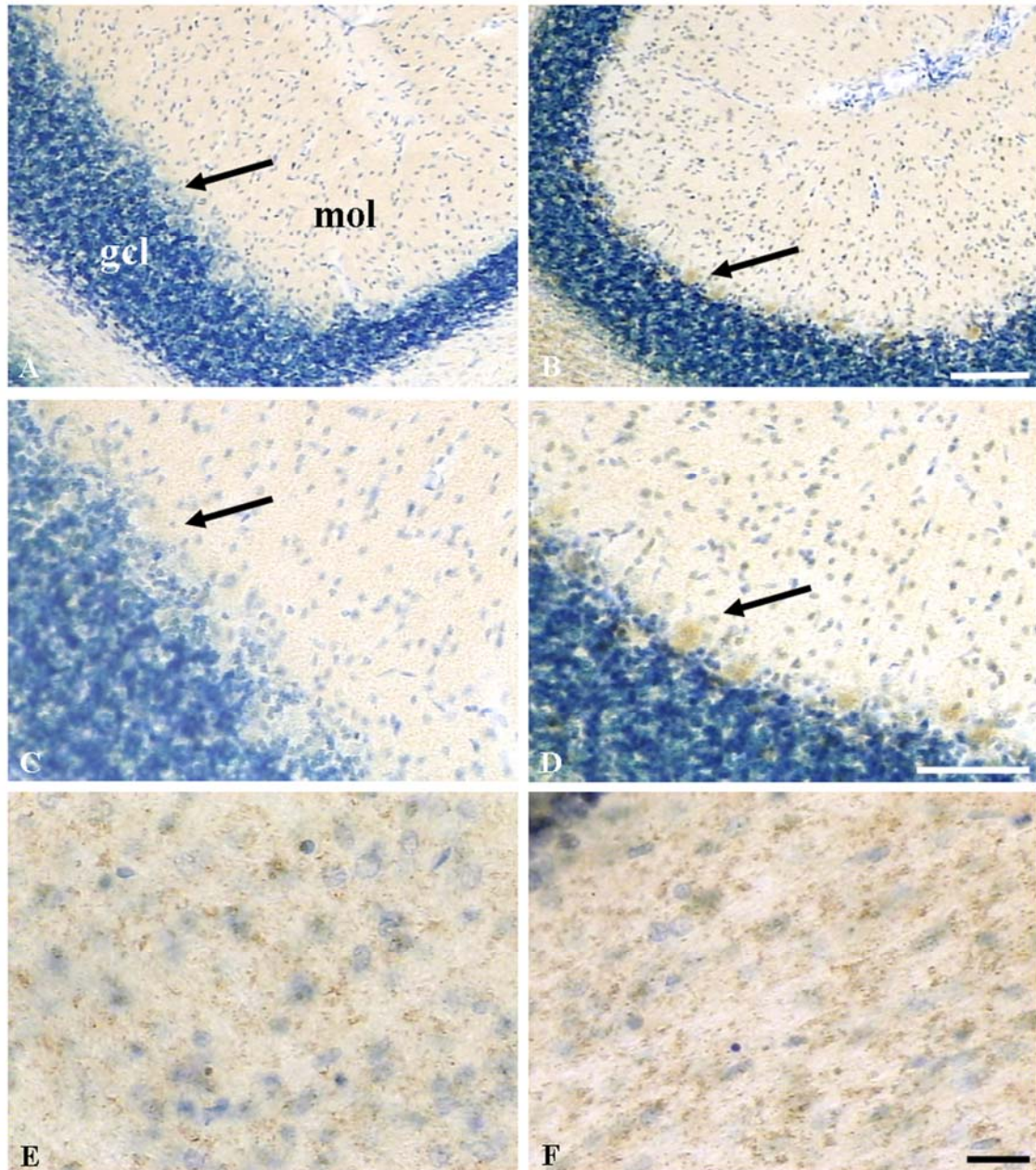


**Fig. 27.** Inmunorreactividad frente a IL-6 en las células de Purkinje (flecha) (A y B) y en la sustancia blanca central de cerebelo (C, D, E, y F) de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C y E) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D y F). E y F, detalle a gran aumento de la sustancia blanca mostrada en las figuras C y D, respectivamente. gcl, capa de células granulares. mol, capa molecular. Escala de las imágenes: 70  $\mu$ m en A y B, 100  $\mu$ m en C y D, 50  $\mu$ m en E y F.

### 1.3.5 Distribución del IL-6R $\alpha$ en el cerebelo

En las ratas control el inmunomarcaje para IL-6R $\alpha$  estaba presente en la sustancia blanca central del cerebelo y prácticamente ausente en la sustancia gris (Fig. 28). Observamos un marcaje puntiforme en el soma y en las proyecciones de las células gliales de la sustancia blanca (Fig. 28). En las ratas con sobrepeso, encontramos una elevada inmunorreactividad frente al IL-6R $\alpha$ , tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris, en contraste con las ratas control. Las células gliales de la sustancia

blanca presentaban una inmunorreactividad más intensa y más abundante que en las ratas control. Además, la mayoría de las células de Purkinje eran inmunorreactivas frente al IL-6R $\alpha$ , a diferencia de las ratas control, en las que se detectaron muy pocas células de Purkinje inmunorreactivas para IL-6R $\alpha$  (Fig. 28).

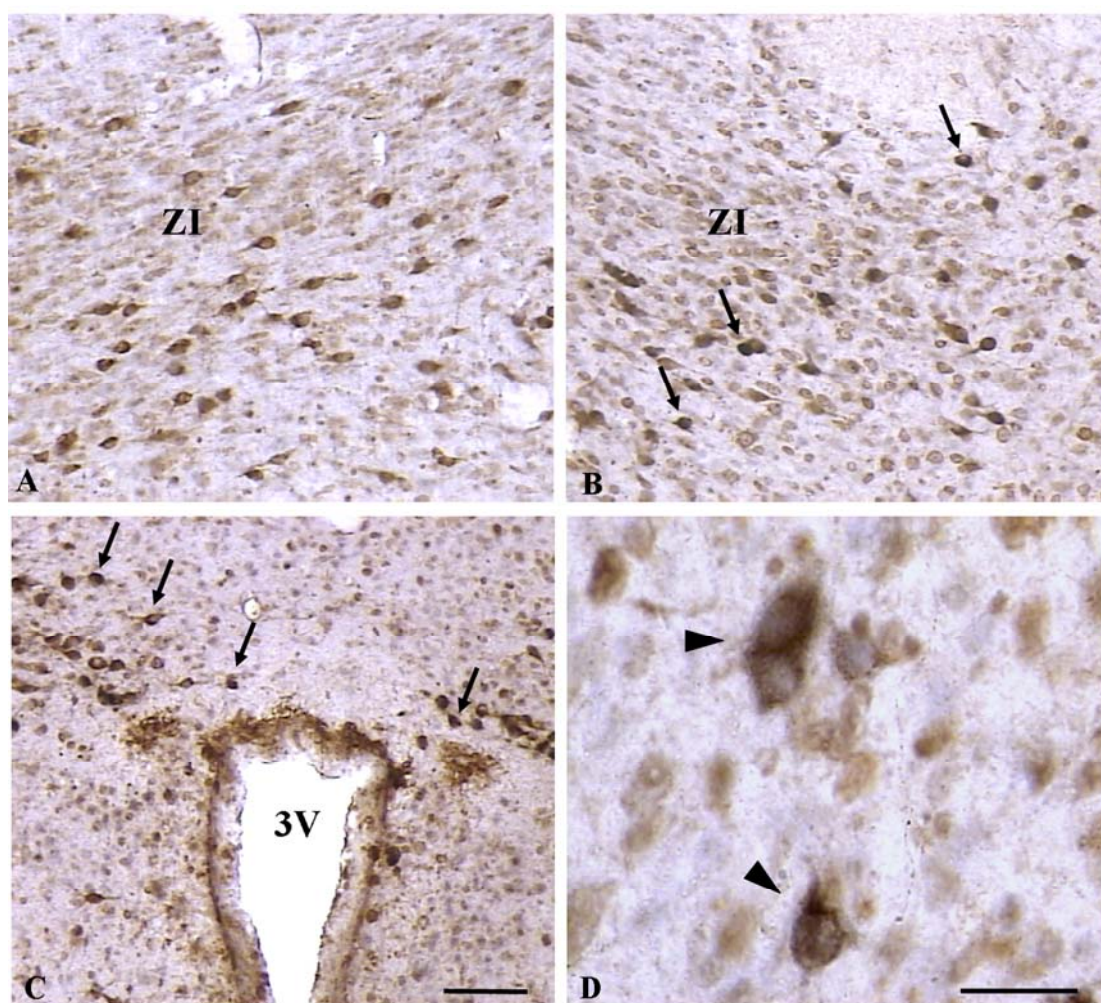


**Fig. 28.** Inmunorreactividad frente a IL-6R $\alpha$  en las células de Purkinje (flecha) (A y B) y en la sustancia blanca central de cerebelo (E, y F) de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A, C y E) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, D y F). C y D, detalle a gran aumento de las células de Purkinje mostradas en las figuras A y B, respectivamente. gcl, capa de células granulares. mol, capa molecular. Escala de las imágenes: 100  $\mu$ m en A y B, 70  $\mu$ m en C y D, 20  $\mu$ m en E y F.



#### 1.4 Localización de la inmunorreactividad del IL-6R $\alpha$ en las neuronas MCHérgicas del hipotálamo

Observando la distribución del marcaje del IL-6R $\alpha$ , encontramos ciertas similitudes con el patrón de expresión de las neuronas productoras de MCH, un neuropéptido orexigénico. Realizamos un doble marcaje de las células inmunorreactivas para MCH y el IL-6R $\alpha$ . Detectamos neuronas MCHérgicas que co-expresaban el IL-6R $\alpha$ . Estas neuronas se encontraban principalmente en la ZI, DA, LHA y Pe (Fig. 29). El patrón de distribución de MCH se localizó en el soma de las neuronas y en algunas proyecciones neuronales (Fig. 29).



**Fig. 29.** Células inmunorreactivas frente a MCH (marrón) e IL-6R $\alpha$  (azul), representadas por una flecha, en la ZI del cerebro de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Las figuras muestran imágenes representativas del grupo control (A) y del grupo de ratas con sobrepeso (B, C y D). D, detalle a gran aumento de algunas células inmunorreactivas frente a MCH e IL-6 R $\alpha$  (punta de flecha). ZI, zona incerta. 3V, tercer ventrículo. Escala de las imágenes: 100  $\mu$ m en A, B y C y 30  $\mu$ m en D.

El análisis estereológico nos reveló que en la ZI de las ratas con sobrepeso, se produjo un aumento significativo de neuronas inmunorreactivas frente a la MCH y el IL-6R $\alpha$  con respecto a las ratas control (Fig. 30A).

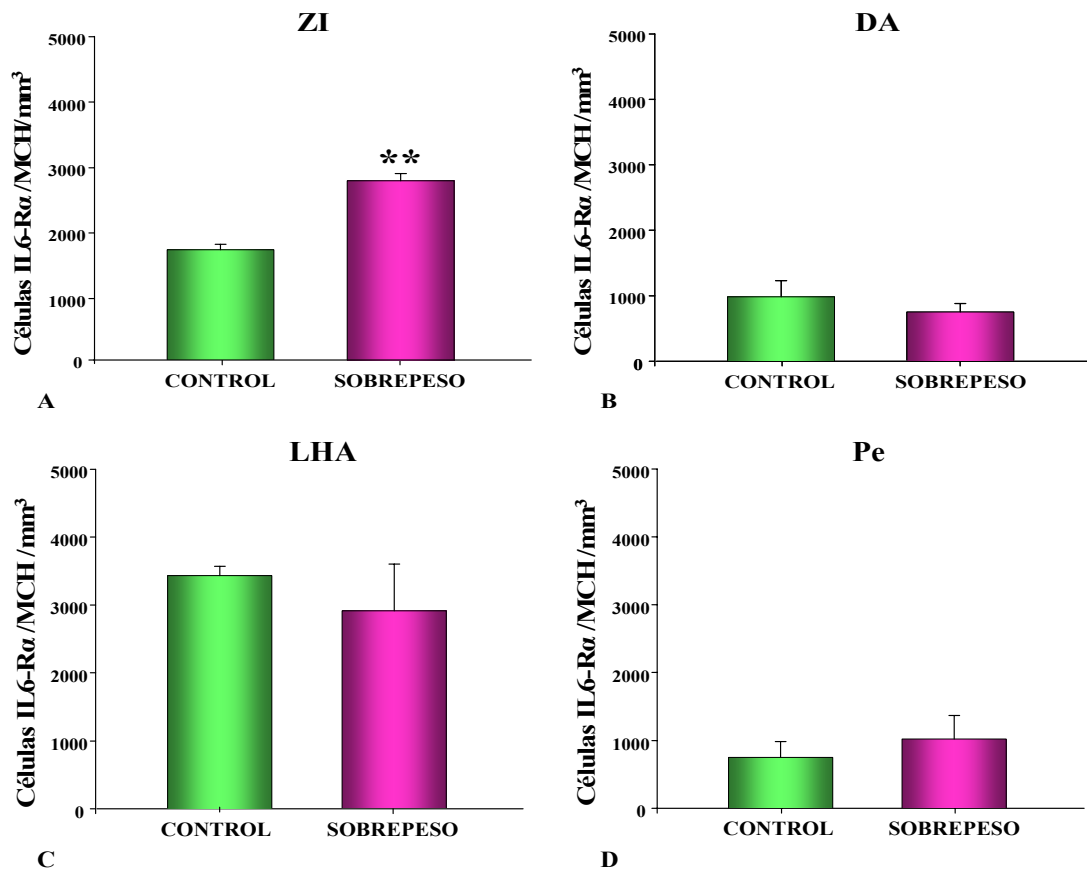


Fig. 30. Células inmunorreactivas frente a MCH y el IL-6R $\alpha$ /mm<sup>3</sup> en ZI (A), DA (B), LHA (C) y Pe (D) del hipotálamo de ratas macho sometidas al modelo de sobrenutrición. Ratas con normopeso (CONTROL, n=6); ratas con sobrepeso (SOBREPESO, n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*\* p < 0,01.

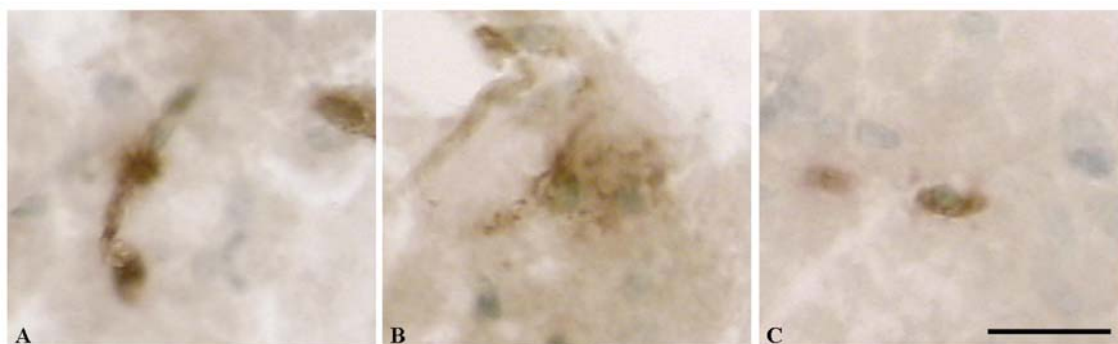
## 2. MODELO DE TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA (ICV)

En este estudio hemos determinado el efecto ejercido por la leptina, una citoquina que se encuentra incrementada en la obesidad, en marcadores de inflamación en el hipotálamo y el cerebelo, centrándonos en la activación de las células de microglía y la regulación de los niveles de la IL-6, del IL-6R $\alpha$  y de los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ .

### 2.1 Efectos de la leptina en el hipotálamo

#### 2.1.1 Microglía inmunorreactiva para MHC-II

Se observaron 3 fenotipos distintos de células inmunorreactivas para MHC-II: 1, con un soma esférico, con múltiples proyecciones muy finas y cortas, 2, con un soma alargado y procesos gruesos y retraídos, y 3, células ameboides sin proyecciones (Fig.31).



**Fig. 31.** Células inmunorreactivas frente a MHC-II en el hipotálamo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv, que presentan morfologías diferentes. A, células de soma esférico, con múltiples proyecciones muy finas y cortas. B, células con fenotipo típico de microglía reactiva, con un soma alargado y procesos gruesos y retraídos. C, células de soma ameboideo sin proyecciones. Escala de las imágenes 20  $\mu$ m.

Analizando conjuntamente las tres formas celulares con el método del disector óptico, detectamos un aumento significativo en el número de células inmunorreactivas para MHC-II en las ratas tratadas con leptina (Fig. 32).



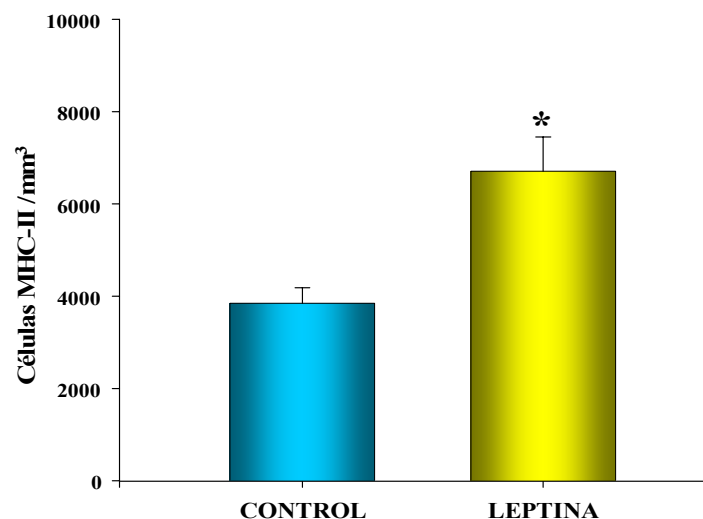


Fig. 32. Células inmunorreactivas para MHC-II/mm<sup>3</sup> en el hipotálamo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL, n=4); leptina (LEPTINA, n=5). Los datos mostrados son la media ± SEM. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

### 2.1.2 Niveles de la IL-6 y del IL-6Rα

La leptina indujo cambios significativos en los niveles de la IL6 y del IL6-Rα con respecto a las ratas control. En las ratas tratadas con leptina se produjo una disminución de los niveles de la IL-6 y un aumento de los niveles del IL-6Rα (Fig. 33).

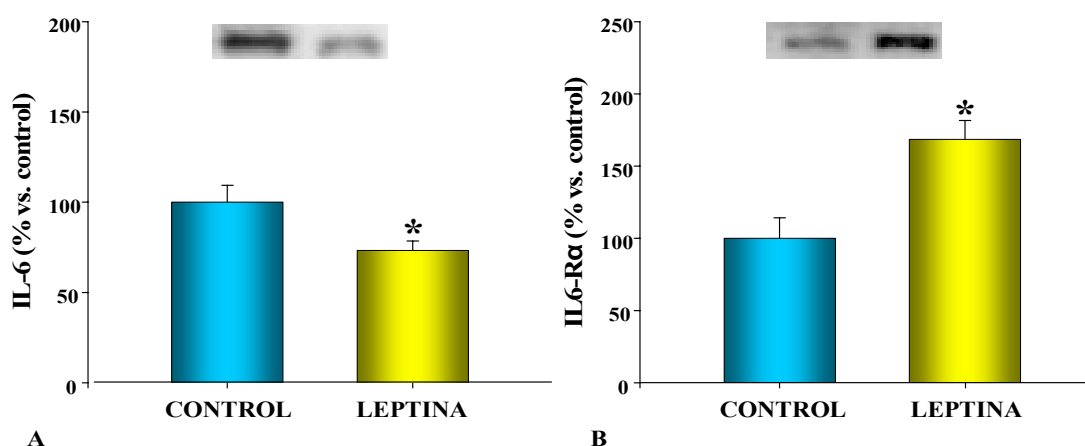
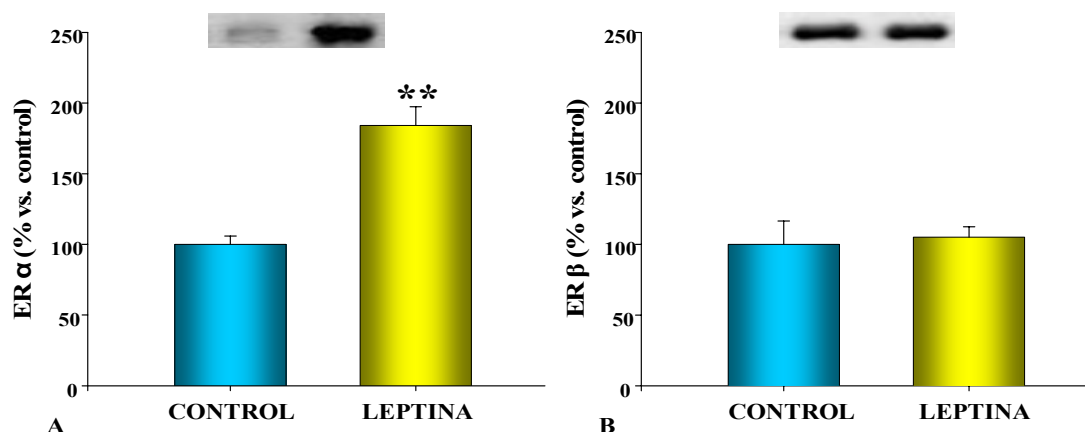


Fig. 33. Niveles relativos de la IL-6 (A) y del IL-6Rα (B) medidos por Western blotting en el hipotálamo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas tratadas con leptina. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL, n=4); leptina (LEPTINA, n=5). Los valores representan la media ± SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

### 2.1.3 Niveles de los receptores de estrógeno

La administración de leptina indujo un aumento significativo en los niveles del ER $\alpha$  con respecto a las ratas control en el hipotálamo (Fig. 34A). Por el contrario, la leptina no tuvo un efecto significativo sobre los niveles del ER $\beta$  (Fig. 34B).

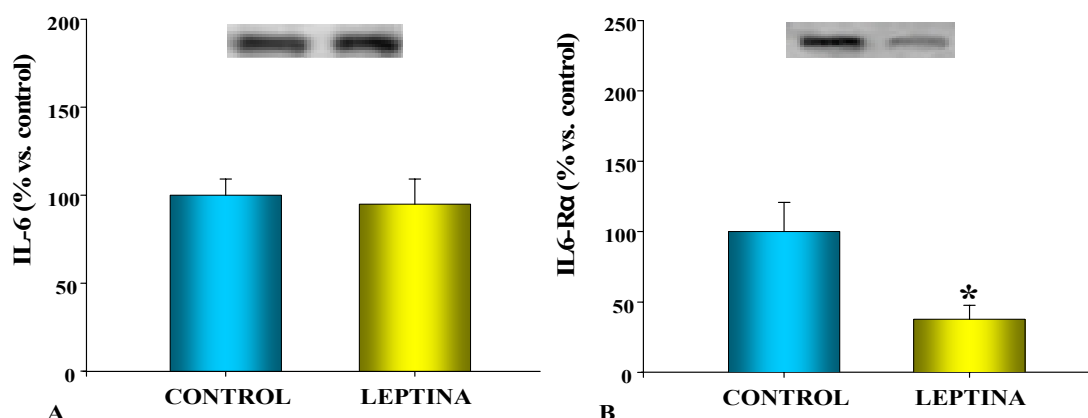


**Fig. 34.** Niveles relativos del ER $\alpha$  (A) y del ER $\beta$  (B) medidos por Western blotting en el hipotálamo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas tratadas con leptina. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL, n=4); leptina (LEPTINA, n=5). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

## 2.2 Efectos de la leptina en el cerebelo

### 2.2.1 Niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$

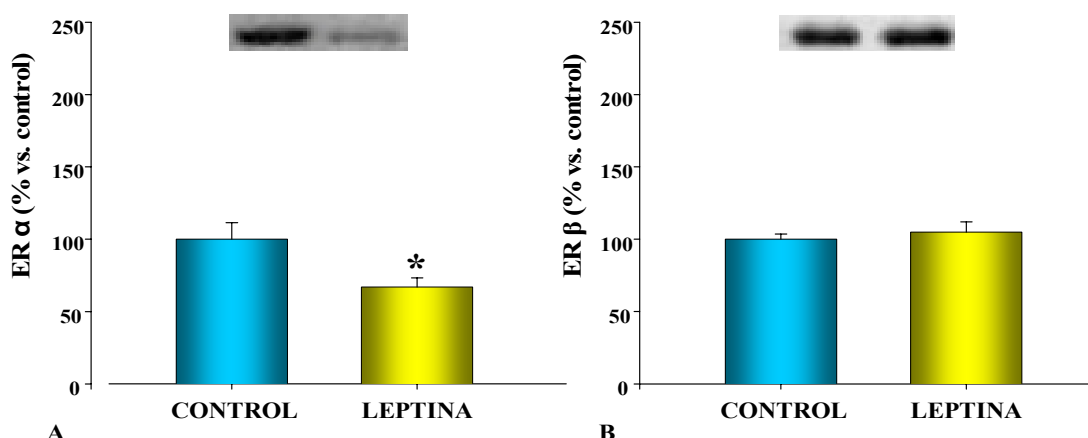
En contraste con su efecto en el hipotálamo, la leptina no indujo cambios significativos en los niveles de la IL-6 en el cerebelo (Fig. 35A). No obstante, la leptina disminuyó los niveles del IL-6R $\alpha$  con respecto a los valores de las ratas control (Fig. 35B).



**Fig. 35.** Niveles relativos de la IL-6 (A) y el IL-6Ra (B) medidos por Western blotting en el cerebelo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas tratadas con leptina. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL, n=4); leptina (LEPTINA, n=5). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

### 2.2.2 Niveles de los receptores de estrógeno en el cerebelo

En el cerebelo la leptina indujo una disminución significativa de los niveles del ER $\alpha$ , a diferencia de lo observado en el hipotálamo (Fig. 36A). Los niveles del ER $\beta$  en el cerebelo no se vieron alterados por el tratamiento (Fig. 36B).



**Fig. 36.** Niveles relativos del ER $\alpha$  (A) y el ER $\beta$  (B) medidos por Western blotting en el cerebelo de ratas macho sometidas a un tratamiento crónico con leptina icv. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas en el grupo control y en el grupo de ratas tratadas con leptina. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL, n=4); leptina (LEPTINA, n=5). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se muestran normalizados con respecto a los valores CONTROL. Diferencias significativas versus valores CONTROL: \*  $p < 0,05$ .

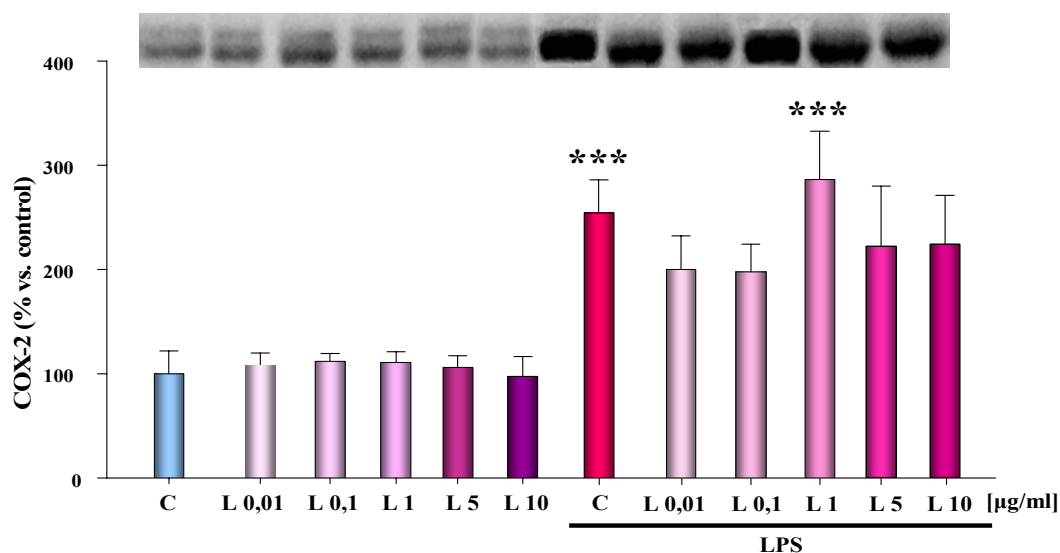
### **3. MODELO DE INFLAMACIÓN IN VITRO**

Los estudios anteriormente realizados en los modelos in vivo de sobrenutrición y de leptina *icv* han puesto de manifiesto que tanto la leptina como los estrógenos tienen un efecto sobre la microglía. Para poder observar la acción directa de estos tratamientos en las células de microglía, sin interferencias de factores circulantes y locales, diseñamos un modelo experimental *in vitro* en las células de microglía BV-2. Estudiamos la activación y proliferación de la microglía, y la modulación de la IL-6 y su receptor, por la implicación del estradiol y la leptina en la función inmune.

#### **3.1 Efectos del LPS y la leptina en las células BV-2**

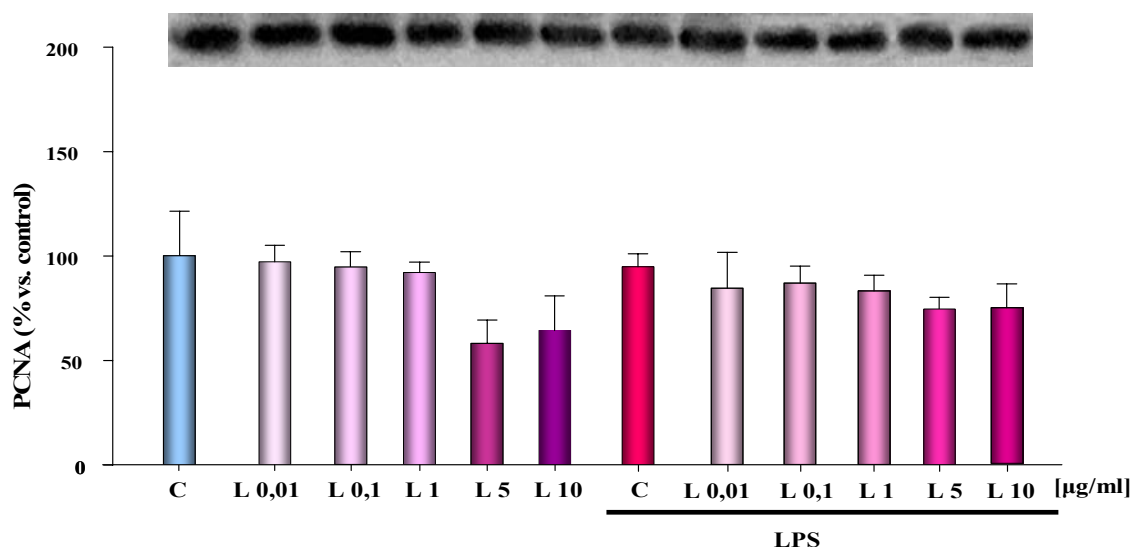
##### **3.1.1 Niveles de COX-2 y PCNA**

Estudiamos la activación de las células de microglía BV-2 por el efecto del LPS, analizando los niveles de la enzima COX-2, que actúa como mediador de la respuesta inmune ante un estímulo como el LPS. El LPS indujo un aumento en los niveles de la COX-2 comparado con el grupo control ( $p < 0,001$ ) (Fig. 37). Sin embargo, ninguna de las dosis ensayadas de leptina (0,01, 0,1, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) indujo variaciones en los niveles de la COX-2 con respecto al grupo control (Fig. 37). Analizamos si la leptina pudiera ejercer un efecto proinflamatorio, potenciando la acción del LPS o antiinflamatorio, inhibiendo el estado de activación de estas células inducido por el LPS. Ninguna de las dosis ensayadas de leptina modificó significativamente los niveles de la COX-2 inducidos por el LPS comparado con las células estimuladas únicamente con el LPS (Fig. 37).



**Fig. 37.** Niveles relativos de la COX-2 en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01µg/ml (L 0,01); leptina 0,1µg/ml (L 0,1); leptina 1 µg/ml (L 1); leptina 5 µg/ml (L 5); leptina 10 µg/ml (L 10); LPS 1 µg/ml (C y LPS); LPS y leptina 0,01µg/ml (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1µg/ml (LPS y L 0,1); LPS y leptina 1 µg/ml (LPS y L 1); LPS y leptina 5 µg/ml (LPS y L 5); LPS y leptina 10 µg/ml (LPS y L 10). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*\*  $p < 0,001$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

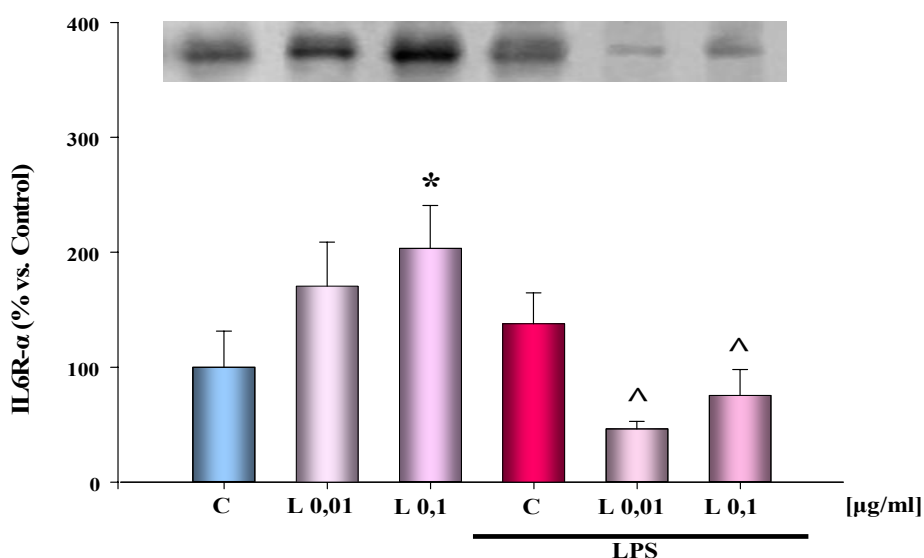
Además, ninguno de los tratamientos alteró la proliferación celular, estudiado mediante la detección de PCNA, en las células BV-2 (Fig. 38).



**Fig. 38.** Niveles relativos de PCNA en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01µg/ml (L 0,01); leptina 0,1µg/ml (L 0,1); leptina 1 µg/ml (L 1); leptina 5 µg/ml (L 5); leptina 10 µg/ml (L 10); LPS 1 µg/ml (C y LPS); LPS y leptina 0,01µg/ml (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1µg/ml (LPS y L 0,1); LPS y leptina 1 µg/ml (LPS y L 1); LPS y leptina 5 µg/ml (LPS y L 5); LPS y leptina 10 µg/ml (LPS y L 10). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. No hay diferencias significativas versus valores C (control). Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.1.2 Niveles del IL-6R $\alpha$

El tratamiento con LPS no indujo cambios en los niveles del IL-6R $\alpha$  en comparación con las células en estado basal, sin embargo, las dos dosis utilizadas de leptina (0,01 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) indujeron un aumento en los niveles del IL-6R $\alpha$ . La respuesta de las células a la combinación de leptina y LPS, resultó en unos niveles del IL-6R $\alpha$  menores que en aquellas células en las que ambos tratamientos por separado estuvieron presentes (ANOVA 2-vías,  $p < 0,01$ ) (Fig. 39). Encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de células tratadas con la dosis mayor de leptina 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). El LPS por si sólo no indujo ningún cambio significativo comparado con la situación control, sin embargo revertió el incremento del IL-6R $\alpha$  causado por la leptina, en las células tratadas con el combinado de leptina más LPS, alcanzando niveles inferiores al estado basal (Fig. 39).



**Fig. 39.** Niveles relativos del IL-6R $\alpha$  en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01 $\mu\text{g/ml}$  (L 0,01); leptina 0,1 $\mu\text{g/ml}$  (L 0,1); LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  (C y LPS); LPS y leptina 0,01 $\mu\text{g/ml}$  (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1 $\mu\text{g/ml}$  (LPS y L 0,1). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*  $p < 0,05$ . Diferencias significativas versus valores L 0,1: ^  $p < 0,05$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.1.3 Expresión del gen de la IL-6

Encontramos una interacción significativa entre el LPS y la leptina sobre la expresión de la IL-6 en las células BV-2 (ANOVA 2-vías,  $p < 0,001$ ). El LPS estimuló la expresión del gen de la IL-6 (Fig. 40). La leptina indujo un aumento significativo proporcional a la dosis administrada, aunque de menor magnitud que la inducida por el

LPS (Fig. 40). La combinación de LPS con leptina, redujo la expresión de la IL-6 hasta alcanzar el estado basal (Fig. 40).

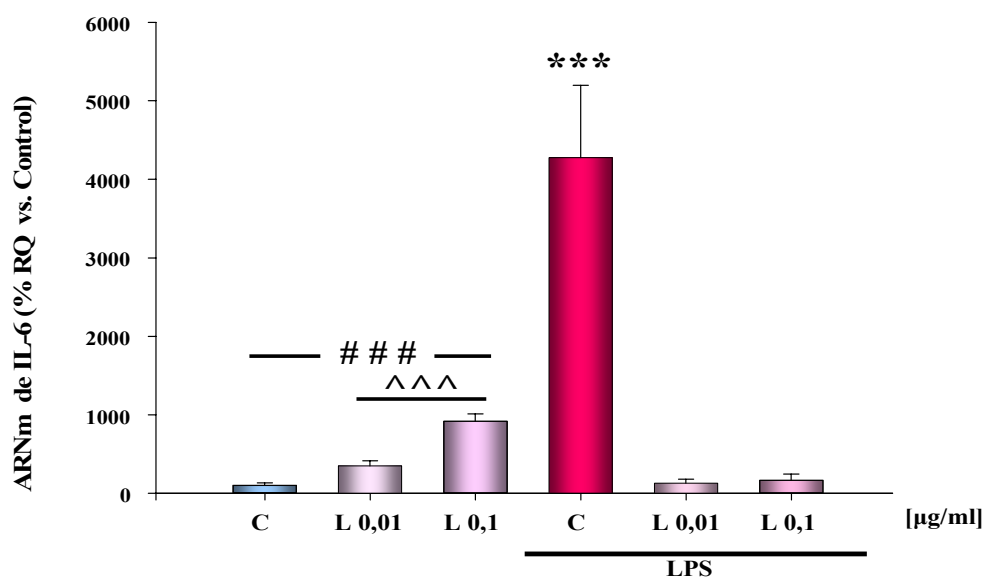
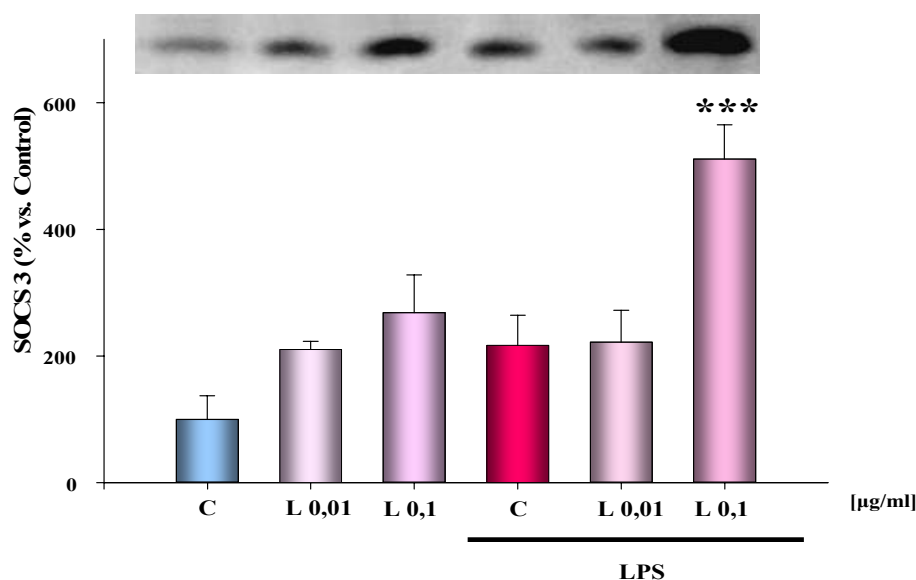


Fig. 40., Expresión relativa del ARNm de IL-6 en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Q-PCR en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01µg/ml (L 0,01); leptina 0,1µg/ml (L 0,1); LPS 1 µg/ml (C y LPS); LPS y leptina 0,01µg/ml (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1µg/ml (LPS y L 0,1). Los valores de ARNm se expresan en % RQ y representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferencias significativas L 0,1 versus valores C (control): ###  $p < 0,001$ ; diferencias significativas L 0,1 versus valores L 0,01: ^^^  $p < 0,001$ .

### 3.1.4 Niveles de SOCS-3

Ninguna de las dosis de leptina ensayadas, ni el LPS, alteraron de forma significativa los niveles de SOCS-3 en las células BV-2. Por el contrario, la combinación del LPS y leptina indujo un aumento significativo de la SOCS-3 en estas células ( $p < 0,001$ ) (Fig. 41).

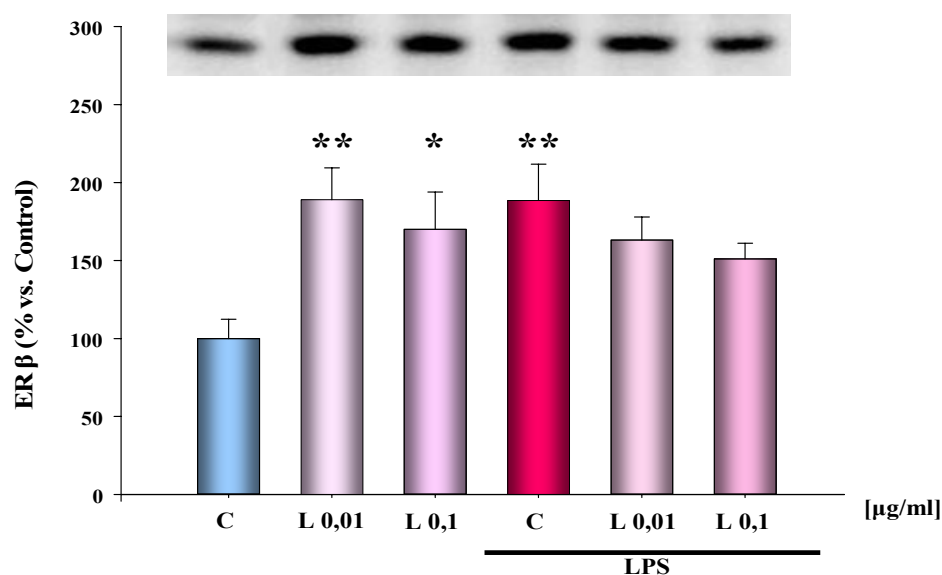


**Fig. 41.** Niveles relativos de SOCS-3 en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01µg/ml (L 0,01); leptina 0,1µg/ml (L 0,1); LPS 1 µg/ml (C y LPS); LPS y leptina 0,01µg/ml (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1µg/ml (LPS y L 0,1). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control sin LPS. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*\*  $p < 0,001$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.1.5 Niveles del ER $\beta$

Como un aspecto previo antes de determinar el efecto del estradiol sobre la respuesta inflamatoria de las células BV-2 decidimos estudiar si estas células expresaban receptores de estrógeno. Estudios previos han documentado la ausencia de expresión del ER $\alpha$  en estas células (Baker y cols, 2004). Comprobamos la ausencia de expresión de ER $\alpha$  en las células BV-2 mediante Western blotting. Por el contrario detectamos la expresión del ER $\beta$ . Además, detectamos una interacción entre la leptina y el LPS sobre la expresión del ER $\beta$  (ANOVA de 2 vías  $p < 0,01$ ). Tanto el LPS como la leptina, indujeron un aumento significativo en los niveles del receptor (Fig. 42). No obstante, los niveles de ER $\beta$  en las células tratadas con leptina y LPS no eran diferentes de los del control ni tampoco de los de las células tratadas con leptina o con LPS por separado (Fig. 42).





**Fig. 42.** Niveles relativos del ERβ en presencia de leptina y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01μg/ml (L 0,01); leptina 0,1μg/ml (L 0,1); LPS 1 μg/ml (C y LPS); LPS y leptina 0,01μg/ml (LPS y L 0,01); LPS y leptina 0,1μg/ml (LPS y L 0,1). Los valores se muestran como la media ± SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control sin LPS. Diferencias significativas versus valores C (control): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

## 3.2 Efectos del LPS y el estradiol en las células BV-2

### 3.2.1 Niveles de COX-2 y PCNA

El estradiol no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de la COX-2, al contrario que el LPS, que tal y como esperábamos, elevó dichos niveles con respecto al control ( $p < 0,001$ ) (Fig. 43). El estradiol en presencia del LPS, no consiguió reducir significativamente el efecto generado por el LPS (Fig. 43). El análisis estadístico de ANOVA de 2 vías no detectó una interacción significativa entre el LPS y el estradiol.

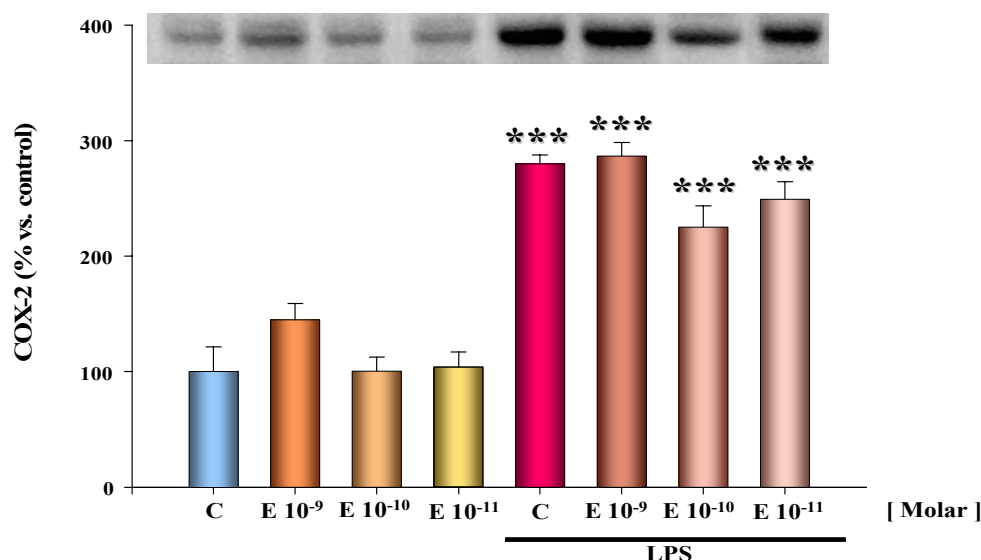


Fig. 43. Niveles relativos de la COX-2 en presencia de  $17\beta$ -estradiol y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); estradiol  $10^{-9}$  M (E  $10^{-9}$ ); estradiol  $10^{-10}$  M (E  $10^{-10}$ ); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); LPS 1  $\mu$ g/ml (C y LPS); LPS y estradiol  $10^{-9}$  M (LPS y E  $10^{-9}$ ); LPS y estradiol  $10^{-10}$  M (LPS y E  $10^{-10}$ ); LPS y estradiol  $10^{-11}$  M (LPS y E  $10^{-11}$ ). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*\*  $p < 0,001$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

Ninguno de los tratamientos alteró los niveles del PCNA, sugiriendo que la proliferación celular en las células BV-2 no está afectado por estos tratamientos (Fig. 44).

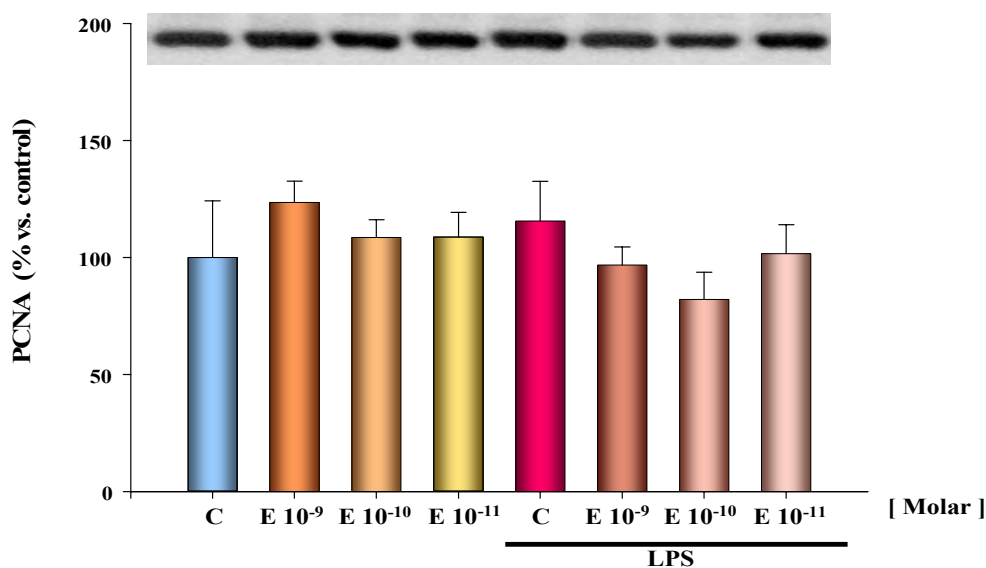
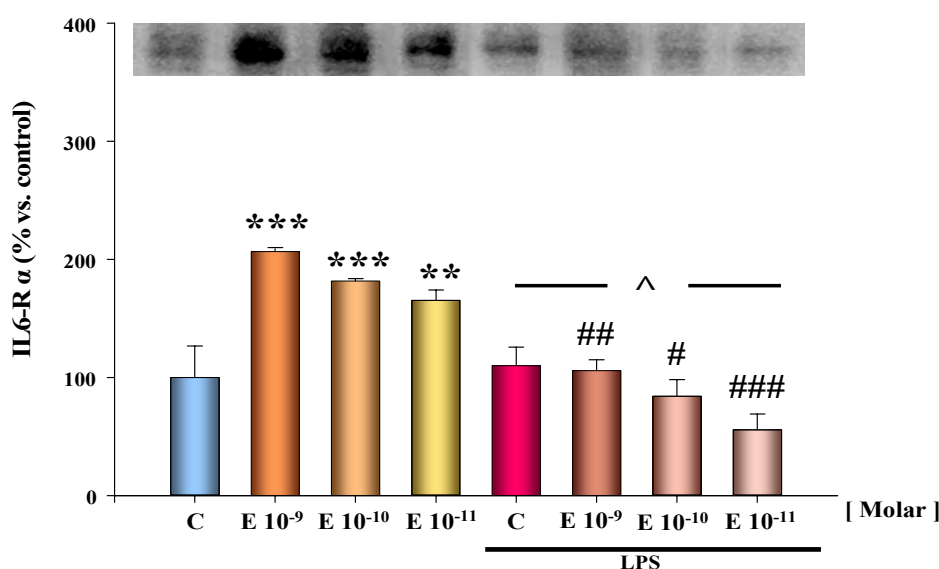


Fig. 44. Niveles relativos del PCNA en presencia de  $17\beta$ -estradiol y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); estradiol  $10^{-9}$  M (E  $10^{-9}$ ); estradiol  $10^{-10}$  M (E  $10^{-10}$ ); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); LPS 1  $\mu$ g/ml (C y LPS); LPS y estradiol  $10^{-9}$  M (LPS y E  $10^{-9}$ ); LPS y estradiol  $10^{-10}$  M (LPS y E  $10^{-10}$ ); LPS y estradiol  $10^{-11}$  M (LPS y E  $10^{-11}$ ). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. No hay diferencias significativas versus valores control. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.2.2 Niveles del IL-6R $\alpha$

Encontramos una interacción entre el LPS y el estradiol (ANOVA 2 vías  $p < 0,001$ ) sobre la expresión del IL-6R $\alpha$ . Tanto el estradiol como el LPS, estaban ejerciendo un efecto significativo en la interacción ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 45). El tratamiento con LPS no indujo cambios en los niveles del IL-6R $\alpha$  en comparación con las células en estado basal. El estradiol provocó un aumento del receptor dependiente de la dosis: a medida que aumentábamos la concentración, las células estimuladas mostraban mayores niveles del IL-6R $\alpha$ . En presencia del LPS, el estradiol no estimuló los niveles del IL-6R $\alpha$ , sino que redujo dichos niveles de una manera dependiente de la dosis (Fig. 45). A la dosis de estradiol  $10^{-11}$  M más LPS, los niveles de IL-6R $\alpha$  eran diferentes significativamente de los de las células tratadas sólo con LPS, pero no respecto a los valores control (Fig. 45).

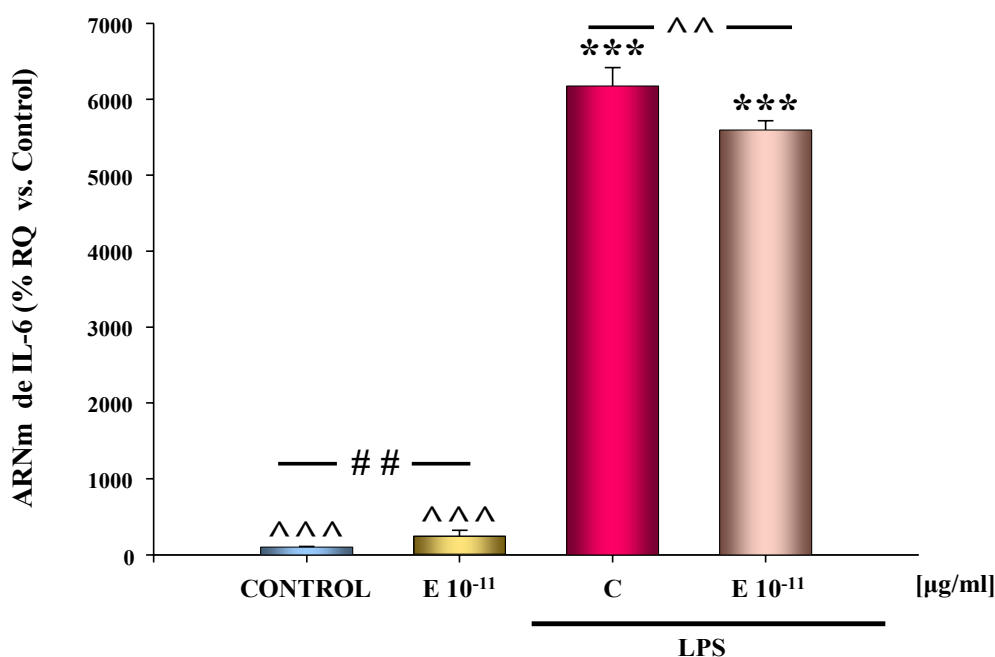


**Fig. 45.** Niveles relativos del IL-6R $\alpha$  en presencia de 17 $\beta$ -estradiol y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); estradiol  $10^{-9}$  M (E  $10^{-9}$ ); estradiol  $10^{-10}$  M (E  $10^{-10}$ ); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); LPS 1  $\mu$ g/ml (C y LPS); LPS y estradiol  $10^{-9}$  M (LPS y E  $10^{-9}$ ); LPS y estradiol  $10^{-10}$  M (LPS y E  $10^{-10}$ ); LPS y estradiol  $10^{-11}$  M (LPS y E  $10^{-11}$ ). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferencias significativas E  $10^{-9}$ , E  $10^{-10}$ , E  $10^{-11}$  versus LPS combinado con E  $10^{-9}$  ó E  $10^{-10}$  ó E  $10^{-11}$ : #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ . Diferencias significativas LPS versus E  $10^{-11}$ : ^  $p < 0,05$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.2.3 Expresión del gen de la IL-6

Encontramos una interacción significativa entre el LPS y el estradiol sobre la expresión de la IL-6 en las células BV2 (ANOVA 2-vías,  $p < 0,001$ ). El LPS estimuló la

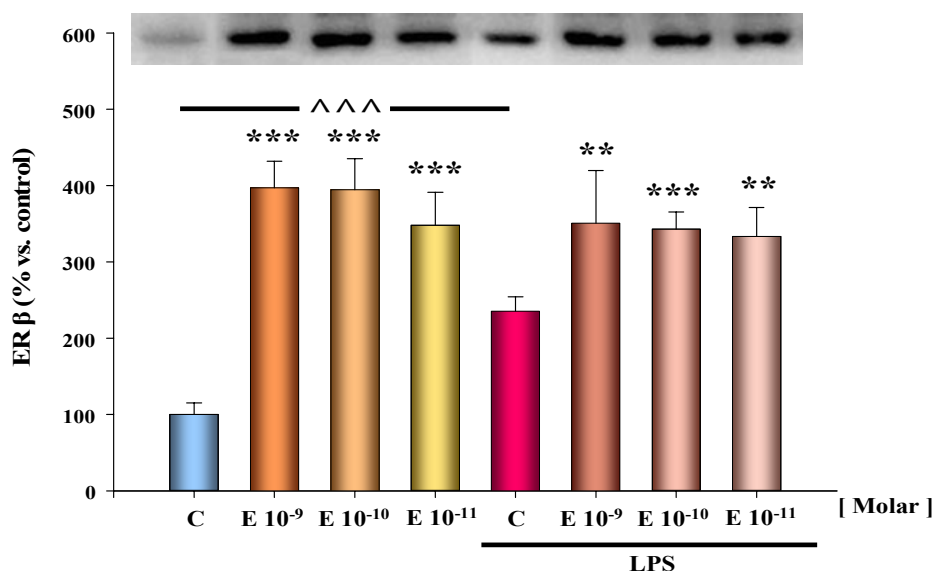
expresión del gen de la IL-6 (Fig. 46). El estradiol indujo un aumento significativo ( $p<0,01$ ) de una magnitud muy inferior a la inducida por el LPS (Fig. 46). La combinación de LPS con estradiol, redujo la expresión de la IL-6 significativamente ( $p<0,001$ ) (Fig. 46).



**Fig. 46.** Expresión relativa del ARNm de IL-6 en presencia de  $17\beta$ -estradiol y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Q-PCR en las células BV-2. Control (C); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  (C y LPS); LPS y estradiol  $10^{-11}$  M (LPS y E  $10^{-11}$ ). Los valores de ARNm se expresan en % RQ y representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus control: \*\*\*  $p<0,001$ ; diferencias significativas versus valores LPS: ^^  $p<0,01$ , ^^^  $p<0,001$ . Prueba T de Student; diferencias significativas E  $10^{-11}$  versus control: ##  $p<0,01$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.2.4 Niveles del ER $\beta$

El estradiol, a la dosis de  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$  M, indujo un incremento del ER $\beta$  en las células de microglía BV-2. Observamos una interacción entre el LPS y el estradiol (ANOVA 2-vías;  $p<0,05$ ) (Fig. 47). Las células tratadas con el combinado de LPS y estradiol también presentaron un incremento del ER $\beta$ . Este resultado fue estadísticamente significativo con respecto al control, pero no con respecto a las células estimuladas con LPS sólo (Fig. 47).



**Fig. 47.** Niveles relativos del ERβ en presencia de 17β-estradiol y/o LPS tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); estradiol 10<sup>-9</sup> M (E 10<sup>-9</sup>); estradiol 10<sup>-10</sup> M (E 10<sup>-10</sup>); estradiol 10<sup>-11</sup> M (E 10<sup>-11</sup>); LPS 1 μg/ml (C y LPS); LPS y estradiol 10<sup>-9</sup> M (LPS y E 10<sup>-9</sup>); LPS y estradiol 10<sup>-10</sup> M (LPS y E 10<sup>-10</sup>); LPS y estradiol 10<sup>-11</sup> M (LPS y E 10<sup>-11</sup>). Los valores se muestran como la media ± SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. Prueba T de Student; diferencias significativas LPS versus C (control): ^^^ p<0,001. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

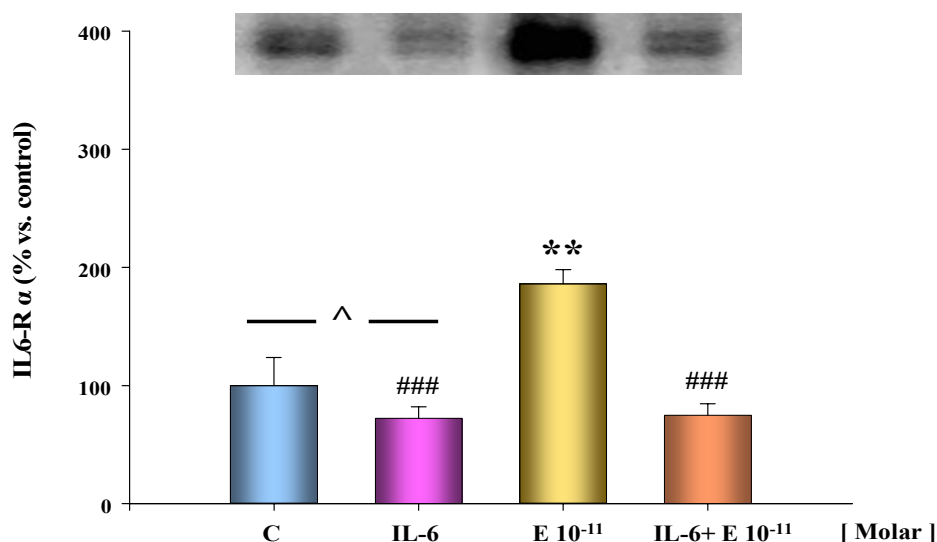
### 3.3 Efectos de la IL-6 y el estradiol en las células BV-2

#### 3.3.1 Niveles del IL-6Rα

En primer lugar quisimos investigar si la IL-6 era capaz de regular a su propio receptor en las células de microglía BV-2, y en segundo lugar, como se regularían los niveles del IL-6Rα por un tratamiento conjunto con la IL-6 y el estradiol.

Como se contempla en la gráfica (Fig. 48), la adición de la IL-6 provocó un descenso ( $p<0,001$ ), y el estradiol un incremento ( $p<0,05$ ) del receptor en estas células. Existía una interacción entre el estradiol y la IL-6 (ANOVA 2-vías,  $p<0,05$ ) (Fig. 48).

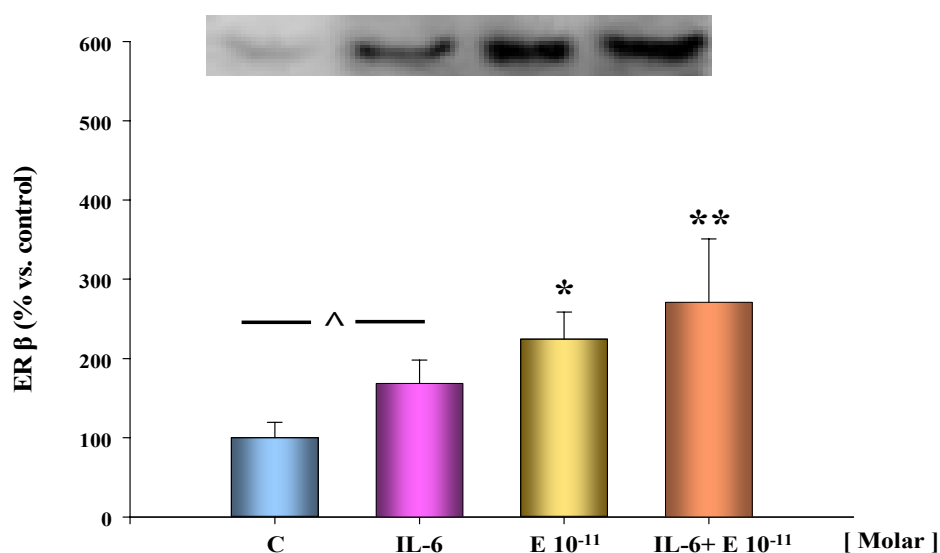
La IL-6 revirtió el incremento inducido por la dosis de estradiol 10<sup>-11</sup> M, llegando a igualar a las células estimuladas sólo con IL-6 (Fig. 48).



**Fig. 48.** Niveles relativos del IL-6Ra en presencia de  $17\beta$ -estradiol y/o IL-6 tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); IL-6 10 ng/ml (IL-6); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); IL-6 y estradiol  $10^{-11}$  M (IL-6 y E  $10^{-11}$ ). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores C (control): \*\*  $p < 0,01$ ; diferencias significativas versus E  $10^{-11}$ : ###  $p < 0,001$ . Prueba T de Student: diferencias significativas IL-6 versus control: ^  $p < 0,05$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.3.2 Niveles del ER $\beta$

La IL-6 y el estradiol ejercieron un efecto significativo sobre los niveles de ER $\beta$ , sin interacción entre ellos ( $p < 0,05$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Ambos tratamientos produjeron un incremento del ER $\beta$  (Fig. 49).



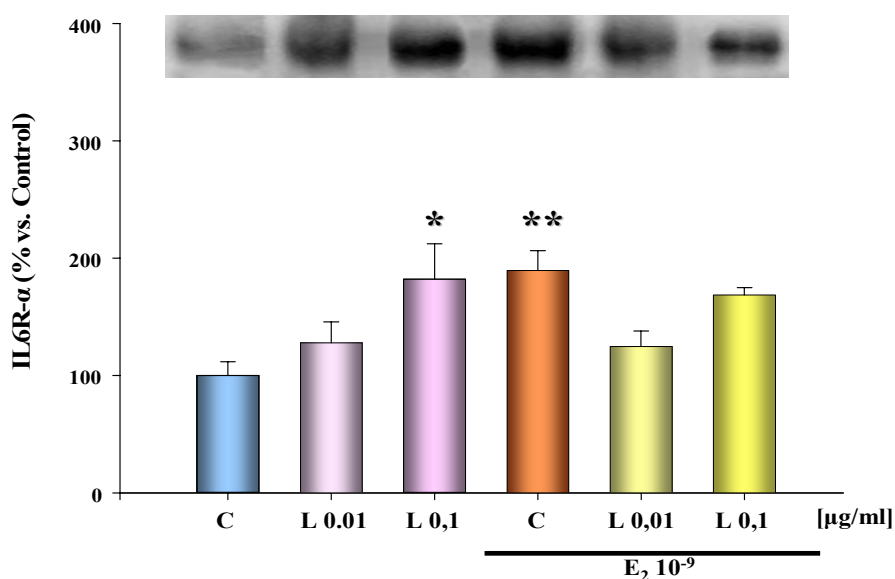
**Fig. 49.** Niveles relativos del ER $\beta$  en presencia de  $17\beta$ -estradiol y/o IL-6 tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); IL-6 10 ng/ml (IL-6); estradiol  $10^{-11}$  M (E  $10^{-11}$ ); IL-6 y estradiol  $10^{-11}$  M (IL-6 y E  $10^{-11}$ ). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores control: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Prueba T de Student: diferencias significativas IL-6 versus control: ^  $p < 0,05$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

### 3.4 Efectos de la leptina y el estradiol en las células BV-2

#### 3.4.1 Niveles del IL-6R $\alpha$

En los anteriores experimentos hemos demostrado que tanto la leptina como el estradiol son capaces de regular al IL-6R $\alpha$  en las células de microglía BV-2, y nos preguntábamos cuál sería la respuesta de estas células, cuando ambos factores estuvieran presentes.

La leptina a una dosis de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  no produjo un efecto significativo mientras que la dosis mayor, de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , incrementó significativamente los niveles del receptor. El estradiol, de nuevo aumentó sus niveles (Fig. 50). Se produjo una interacción significativa entre los tratamientos (ANOVA 2-vías  $p < 0.01$ ) y el tratamiento combinado de leptina y estradiol no produjo ningún cambio significativo en los niveles del receptor (Fig. 50).



**Fig. 50.** Niveles relativos del IL-6R $\alpha$  en presencia de leptina y/o  $E 10^{-9}$  tras 24 horas de tratamiento medidos por Western blotting en las células BV-2. Los tratamientos fueron los siguientes: control (C); leptina 0,01  $\mu\text{g/ml}$  (L 0,01); leptina 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (L 0,1);  $E 10^{-9}$  M ( $E 10^{-9}$ );  $E 10^{-9}$  y leptina 0,01  $\mu\text{g/ml}$  ( $E 10^{-9}$  y L 0,01);  $E 10^{-9}$  y leptina 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ( $E 10^{-9}$  y L 0,1). Los valores se muestran como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, realizados en duplicado y normalizados con respecto a los valores control. Diferencias significativas versus valores control: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas para cada uno de los grupos experimentales.

#### 4. MODELO DE INFLAMACIÓN IN VIVO

En este grupo de experimentos hemos estudiado el efecto del LPS en los cambios de peso corporal, los niveles de leptina séricos, además de las acciones del estradiol y varios compuestos estrogénicos en la activación microglial y la expresión de la IL-6 y su receptor (IL-6R $\alpha$ ) en el cerebelo, en un modelo de inflamación periférica generado por la administración sistémica de LPS.

##### 4.1 Efecto del LPS sobre el peso corporal y los niveles de leptina

Las ratas tratadas con LPS experimentaron una disminución significativa del peso corporal comparadas con las controles. Esta diferencia fue observada a los 3 días de la primera inyección de LPS ( $241\pm6,2$  g y  $218\pm6,0$  g, control y LPS respectivamente;  $p<0,05$ ) y a los 4 días desde la segunda administración ( $256\pm5,7$  g y  $232\pm4,7$  g, control y LPS respectivamente;  $p<0,01$ ). La diferencia en el incremento de peso entre ambos grupos fue más prominente en los 3 primeros días, donde las ratas tratadas con LPS experimentaron una ganancia negativa con respecto al control ( $11,0\pm1,6$  g y  $-2,4\pm2,3$  g, control y LPS respectivamente;  $p<0,001$ ), que en los últimos 4 días, donde la ganancia de peso fue positiva pero menor que la experimentada por el grupo control ( $14,9\pm1,6$  g y  $8,4\pm2,6$  g, control y LPS respectivamente;  $p<0,05$ ) (Fig. 51).

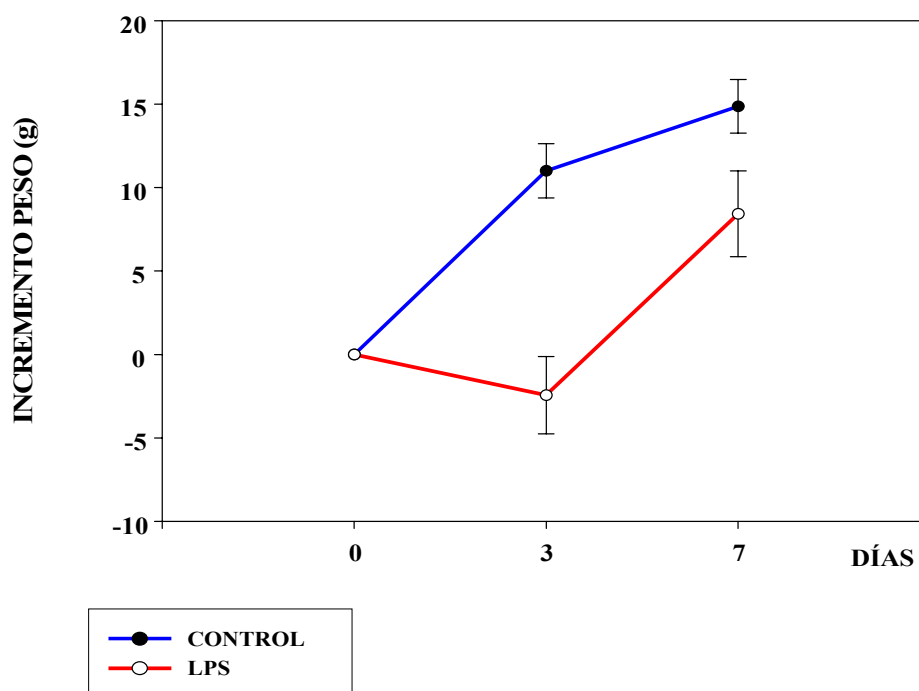


Fig. 51. Gráfica que muestra el incremento de peso experimentado por las ratas hembra de 1 semana de ovariectomía en respuesta a LPS. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo (CONTROL,  $n=8$ ) y LPS (LPS y vehículo,  $n=9$ ). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM.



Las ratas tratadas con LPS, también experimentaron una disminución significativa en los niveles plasmáticos de leptina (Fig. 52).

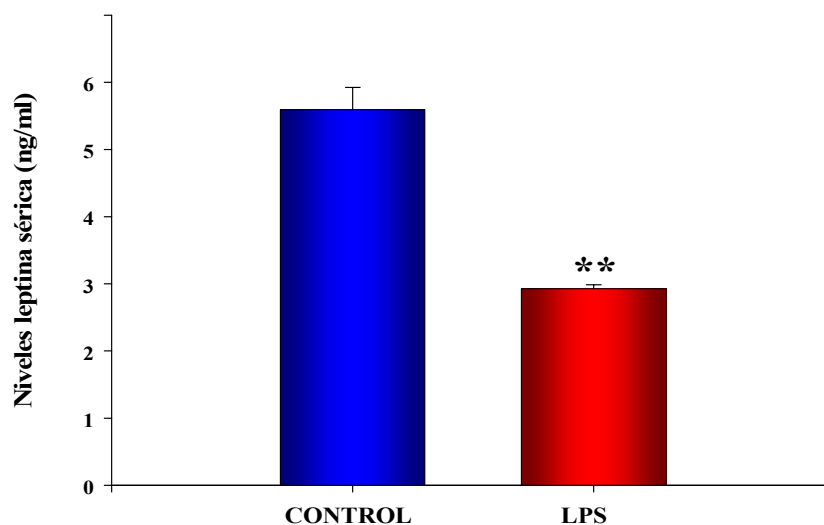


Fig. 52. Niveles de leptina en suero en las ratas de 1 semana de ovariectomía tratadas con LPS. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículos (CONTROL,  $n=8$ ) y LPS (LPS y vehículo,  $n=9$ ) Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores control: \*\*  $p<0,01$ .

## 4.2 Modulación de la IL-6 y el IL-6R $\alpha$ en el cerebelo

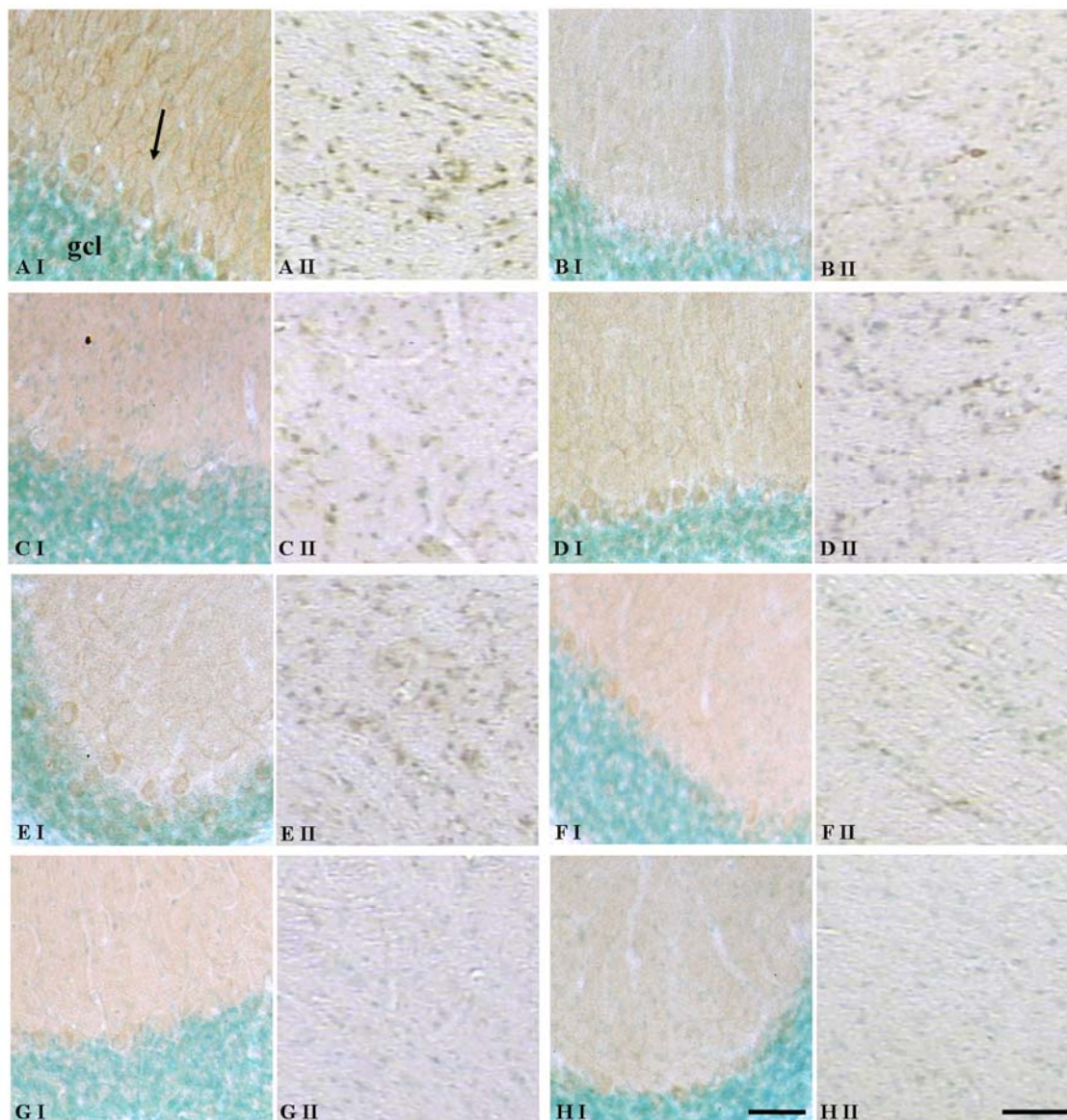
### 4.2.1 Efectos del LPS y de compuestos estrogénicos sobre las células inmunorreactivas para la IL-6

En este estudio, analizamos el efecto del estradiol y de compuestos estrogénicos sobre los niveles de IL-6 en ratas tratadas con LPS una semana después de la ovariectomía.

En las ratas control se detectó una alta densidad de células IL-6 inmunorreactivas incluyendo células de glía, localizadas predominantemente en la sustancia blanca central del cerebelo. También encontramos inmunomarcaje en la capa molecular, la capa granular y las neuronas de Purkinje. (Fig. 53). El patrón de la inmunorreactividad frente a la IL-6 se concentró en el citoplasma perinuclear, perfilando los núcleos y fue menos evidente en los procesos de las células de glía. El inmunomarcaje frente a IL-6 en las neuronas de Purkinje se localizó fundamentalmente en el citoplasma y con menor intensidad en el árbol dendrítico (Fig. 53).

Las células IL-6 inmunorreactivas fueron abundantes en las ratas tratadas con LPS, aunque no observamos tantas células como en las ratas control (Fig. 53). En los

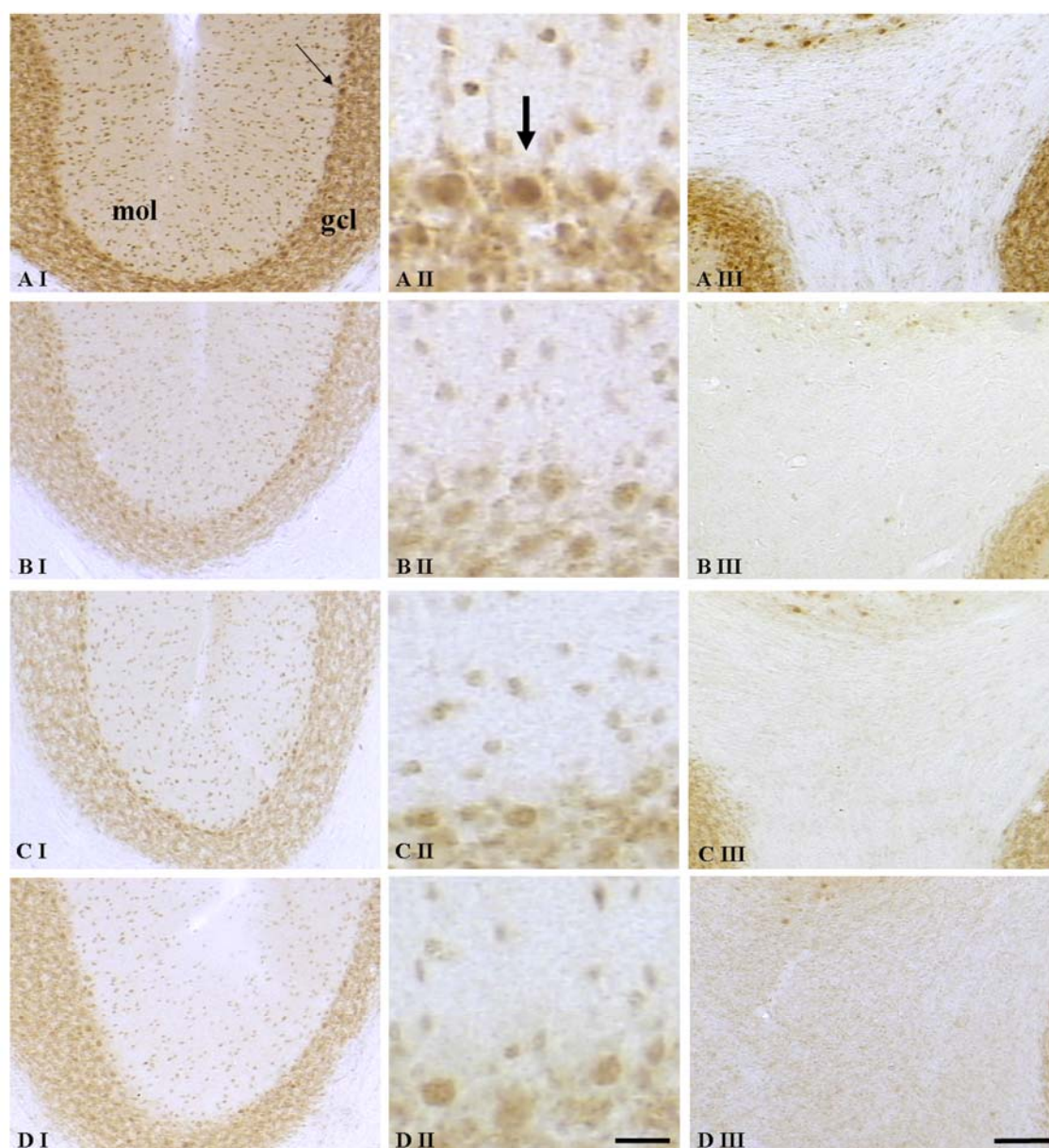
animales tratados con estradiol (250 µg/kg), tamoxifeno (1 mg/kg) ó raloxifeno (1 mg/kg), tratados o no con LPS, encontramos pocas células inmunorreactivas para IL-6 (Fig. 53).



**Fig. 53.** Inmunorreactividad frente a IL-6 en las células de Purkinje (flecha) (A I- H I) y en la sustancia blanca central de cerebelo (A II- H II) de ratas hembra en las se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 semana después de la ovariectomía. Las figuras muestran imágenes representativas después de administrar los siguientes tratamientos: A, vehículos; B, 17β-estradiol 250 µg/Kg; C, tamoxifeno 1 mg/Kg; D, raloxifeno 1 mg/Kg; E, LPS; F, 17β-estradiol 250 µg/Kg y LPS; G, tamoxifeno 1 mg/Kg y LPS; H, raloxifeno 1 mg/Kg y LPS. gcl, capa de células granulares Escala de las imágenes 50 µm.

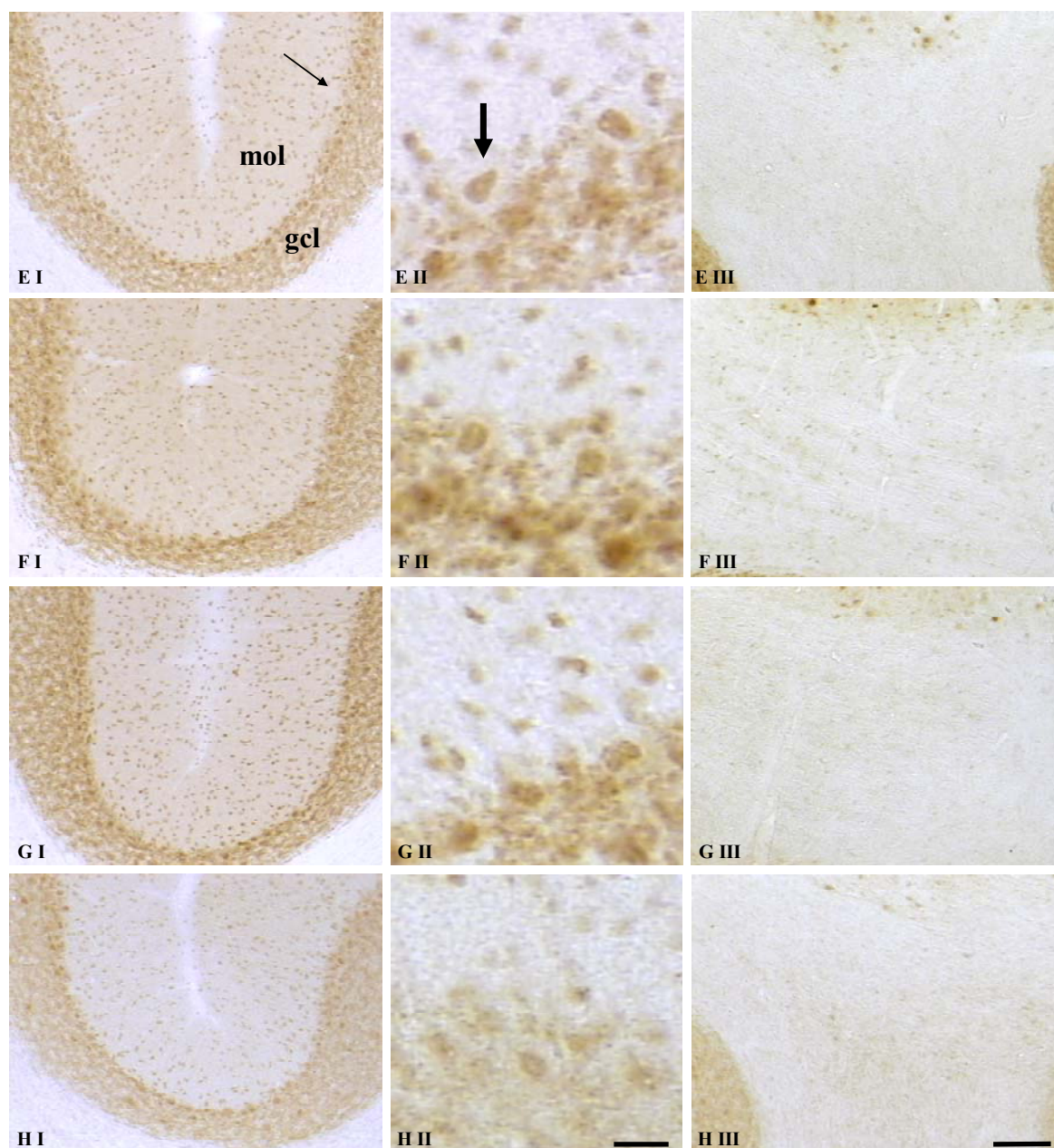
#### **4.2.2 Efectos del LPS y de compuestos estrogénicos sobre las células inmunorreactivas para la IL-6R $\alpha$**

Realizamos el siguiente experimento con el fin de determinar si las variaciones observadas en la IL-6, podrían afectar a la expresión y localización del IL-6R $\alpha$ , en el cerebelo. Se observó inmunomarcaje para IL-6R $\alpha$  en la sustancia blanca y en las capas; granular, de células de Purkinje y molecular, concentrado en el soma celular. Hallamos diferencias obvias en la densidad de células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas de la capa de células de Purkinje y en la sustancia blanca, entre los diversos grupos experimentales (Figs. 54 y 55).



**Fig. 54.** Inmunorreactividad frente a IL-6R en las capas de una folia (A I- D I) y en la sustancia blanca central del cerebelo (A III- D III) de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 semana después de la ovariectomía. Las figuras muestran imágenes representativas después de administrar los siguientes tratamientos: A, vehículos; B,  $17\beta$ -estradiol 250  $\mu$ g/Kg; C, tamoxifeno 1 mg/Kg; D, raloxifeno 1 mg/Kg. Las imágenes A II- D II, muestran en detalle a gran aumento las células de Purkinje (flecha) mostradas en las figuras A I-D I. gcl, capa de células granulares. mol, capa molecular. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m. Escala de las figuras a gran aumento 20  $\mu$ m.



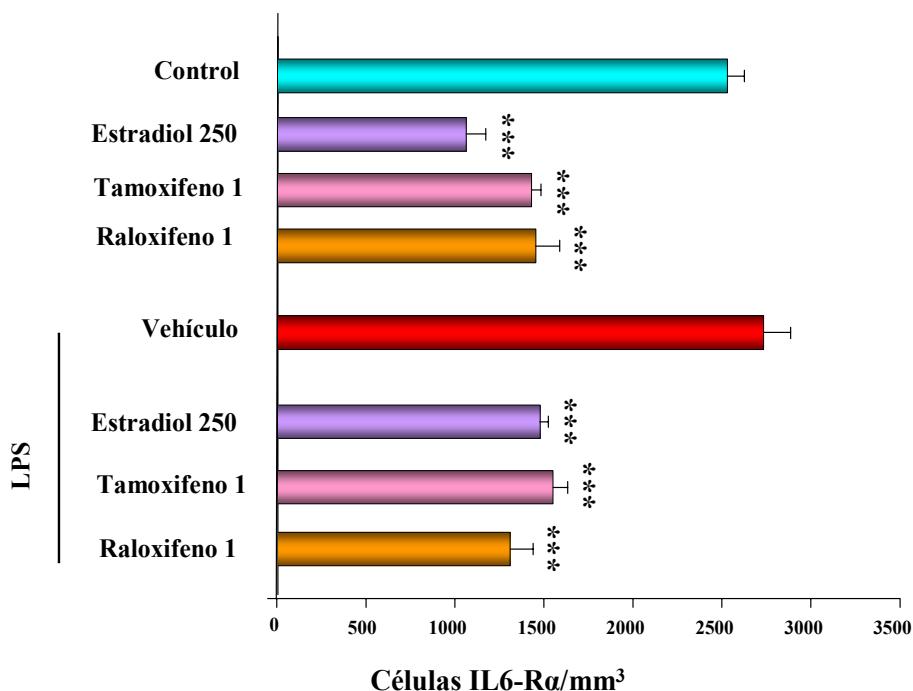


**Fig. 55.** Inmunorreactividad frente a IL-6R en las capas de una folia (E I- H I) y en la sustancia blanca central del cerebelo (E III- H III) de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 semana después de la ovariectomía. Las figuras muestran imágenes representativas después de administrar los siguientes tratamientos: E, LPS; F, 17 $\beta$ -estradiol 250  $\mu$ g/Kg y LPS; G, tamoxifeno 1 mg/Kg y LPS; H, raloxifeno 1 mg/Kg y LPS. Las imágenes E II- H II, muestran en detalle a las células de Purkinje (flecha) IL-6R inmunorreactivas a gran aumento. gcl, capa de células granulares. mol, capa molecular. Escala de las imágenes 100  $\mu$ m. Escala de las células de Purkinje 20  $\mu$ m.

Realizamos un análisis estereológico, con el método del disector óptico, en la capa de células de Purkinje. El número de células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas no cambió significativamente por la administración de LPS en comparación con los valores de las ratas control (Fig. 56). Por el contrario, los tratamientos con el estradiol, con el tamoxifeno, o con el raloxifeno redujeron significativamente el número de las células de

Purkinje inmunorreactivas para IL-6R $\alpha$ , respecto a los valores de las ratas control (Fig. 56).

El estradiol administrado en ratas inyectadas con LPS produjo una reducción significativa del número de células IL-6R $\alpha$  inmunorreactivas, en comparación con las ratas control y con las ratas inyectadas con LPS sólo (Fig. 56). El tamoxifeno y el raloxifeno ejercieron un efecto similar en las ratas tratadas con LPS (Fig. 56).



*Fig. 56. Número de células inmunorreactivas para IL-6R $\alpha$  /mm<sup>3</sup> en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS 1 semana después de la ovariectomía. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículos (Control, n=5); estradiol 250  $\mu$ g/Kg (Estradiol 250, n=4); tamoxifeno 1 mg/Kg (Tamoxifeno 1, n=4); raloxifeno 1 mg/Kg (Raloxifeno 1, n=4); LPS (LPS y Vehículo, n=5); LPS y estradiol 250  $\mu$ g/Kg (LPS y Estradiol 250, n=5); LPS y tamoxifeno 1 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 1, n=4); LPS y raloxifeno 1 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 1, n=4). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores de LPS y vehículo: \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferencias significativas versus valores control: \*\*\*  $p < 0,001$ .*

### 4.3 Modulación de la activación microglial en el cerebelo

#### 4.3.1 Efectos del LPS sobre la microglía

En este estudio utilizamos la inmunorreactividad frente a MHC-II para detectar a la microglía reactiva. Las células inmunorreactivas para MHC-II fueron muy escasas en el cerebelo de las ratas control (Figs. 57, 59 y 61). Por el contrario, en las ratas inyectadas con el LPS, tanto en los machos como en las hembras, las células inmunorreactivas para MHC-II fueron muy abundantes (Figs. 57, 59 y 61) y mostraron somas más anchos y procesos más gruesos y retraídos (comparar los insertos en Figs. 57A, E y 59A, E) que en las inyectadas con vehículo. Utilizando el anticuerpo ED-1, un

marcador de microglía fagocítica, observamos diferencias cualitativas similares a las obtenidas con el anticuerpo MHC-II (datos no mostrados).

El número de células MHC-II inmunorreactivas, estimado con el método del disector óptico, fue significativamente mayor en los machos y en las hembras inyectadas con el LPS que en los animales inyectados con el vehículo (Figs. 58, 60 y 62). Por el contrario, el tratamiento con el LPS no afectó al número total de células microgliales, marcadas con el pan marcador de microglía OX-42 (machos: controles  $6906 \pm 413$  células/mm<sup>3</sup>, n=10; LPS,  $8571 \pm 272$  células/mm<sup>3</sup>, n=19; hembras: controles,  $7258 \pm 414$  células/mm<sup>3</sup>, n=9; LPS,  $8116 \pm 222$  células/mm<sup>3</sup>, n=19).

Empleando inmunohistoquímica frente a vimentina para detectar astroglia reactiva, no encontramos astrocitos reactivos. Mediante inmunohistoquímica frente a histona 3 fosforilada, un marcador de proliferación celular, no hayamos diferencias significativas entre las ratas tratadas con LPS y los inyectados con vehículo (datos no mostrados).

#### **4.3.2 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas macho**

La administración de 17  $\beta$ -estradiol a ratas macho tratadas con LPS resultó en una disminución en el número de células MHC-II inmunorreactivas de manera dependiente de la dosis (Figs. 57 y 58). Las ratas inyectadas con LPS y tratadas con estradiol, a las dosis de 50 y 250 mg/kg, mostraron una disminución en el número de células MHC-II inmunorreactivas hasta valores que fueron significativamente más bajos que en aquellas ratas inyectadas con sólo LPS, y no fueron significativamente diferentes de los valores control. Además las células marcadas para MHC-II, en las ratas inyectadas con LPS y con estradiol a las dosis de 50 y 250  $\mu$ g/kg, mostraron procesos celulares más finos y largos y somas celulares más pequeños que en las ratas inyectadas con únicamente LPS (comparar los insertos Figs. 57E y F).

Las dosis más altas de estradiol no redujeron significativamente el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II en las ratas inyectadas con LPS. El estradiol (250  $\mu$ g/kg) no modificó de una manera significativa el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II en animales no tratados con LPS (Figs. 57 y 58).

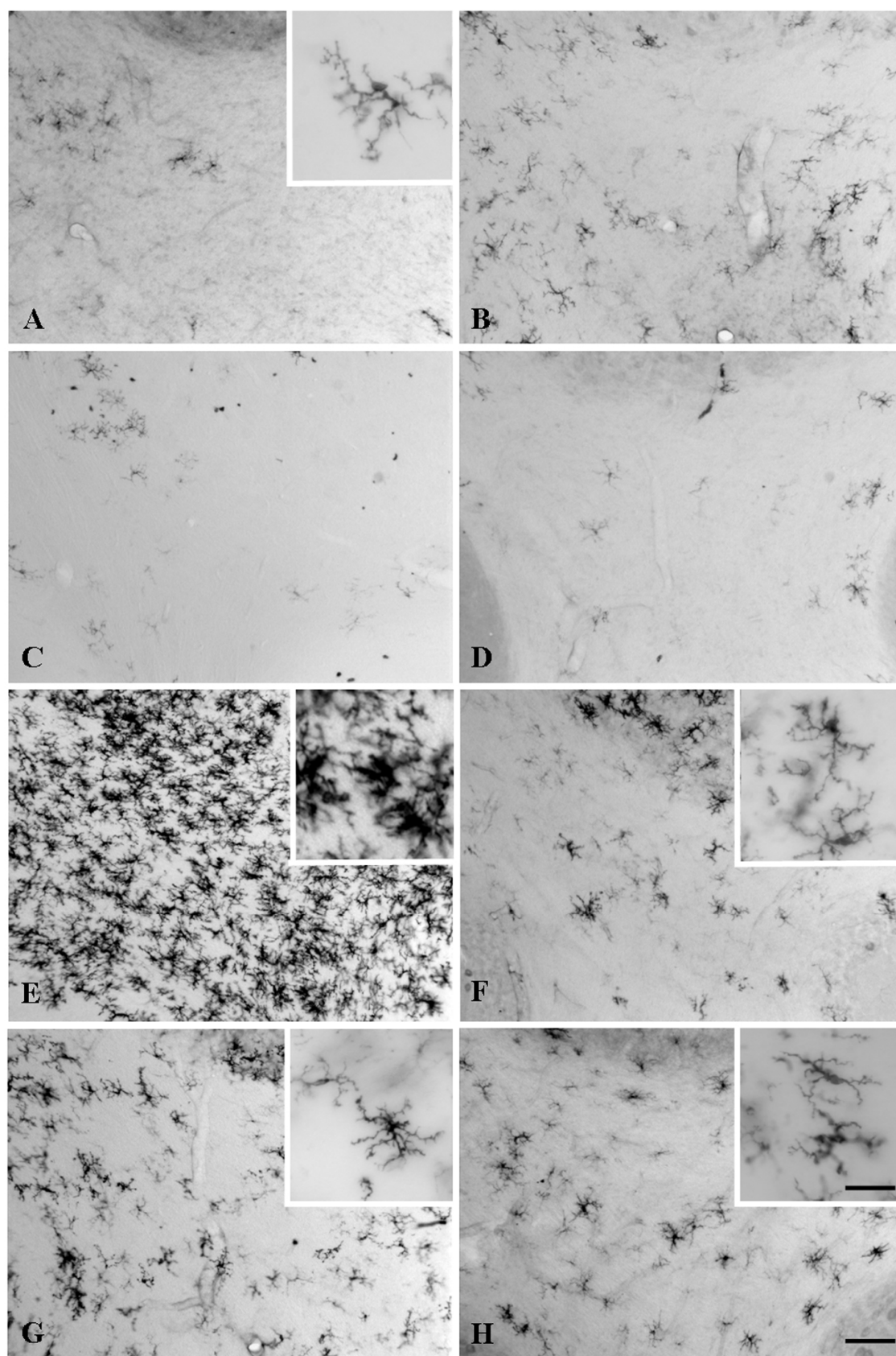
En contraste con el efecto dosis dependiente del estradiol, todas las dosis de tamoxifeno analizadas en las ratas inyectadas con LPS (en el rango de 0,5 a 2 mg/kg)

fueron capaces de reducir significativamente el número de células MHC-II inmunorreactivas en comparación con los valores de animales inyectados con sólo LPS (Figs. 57 y 58). Las células MHC-II inmunorreactivas mostraron procesos celulares más largos y finos y somas celulares más pequeños en las ratas inyectadas con tamoxifeno y LPS en comparación con los animales inyectados con sólo LPS (comparar los insertos en Figs. 57E y G).

El raloxifeno fue capaz de reducir significativamente el número de células MHC-II inmunorreactivas y la morfología reactiva (comparar los insertos en Figs. 57E y H), en animales inyectados con LPS en comparación con las ratas inyectadas con sólo LPS, pero únicamente a las dosis de 0.5 y 1 mg/kg (Figs. 57 y 58). El tamoxifeno y raloxifeno *per se* (1 mg/kg), en ausencia de LPS, no afectaron al número de células MHC-II inmunorreactivas (Figs. 57 y 58).

El número de células inmunorreactivas para OX-42 no se vio afectado por los tratamientos experimentales con compuestos estrogénicos, ni en las ratas tratadas con LPS ni en las tratadas con vehículo (datos no mostrados).





**Fig. 57.** Imágenes representativas de la sustancia blanca central de cerebelo de ratas macho que muestran inmunorreactividad para MHC-II después de administrar los siguientes tratamientos: A, vehículos de los compuestos estrogénicos (DMSO) y LPS (tampón fosfato); B,  $17\beta$ -estradiol 250  $\mu\text{g/Kg}$ ; C, tamoxifeno 1 mg/Kg; D, raloxifeno 1 mg/Kg; E, LPS; F,  $17\beta$ -estradiol 250  $\mu\text{g/Kg}$  y LPS; G, tamoxifeno 1 mg/Kg y LPS; H, raloxifeno 1 mg/Kg y LPS. Los insertos muestran detalles de la morfología de las células MHC-II inmunoreactivas a gran aumento. Escala de las imágenes 100  $\mu\text{m}$ . Escala de los insertos 25  $\mu\text{m}$ .

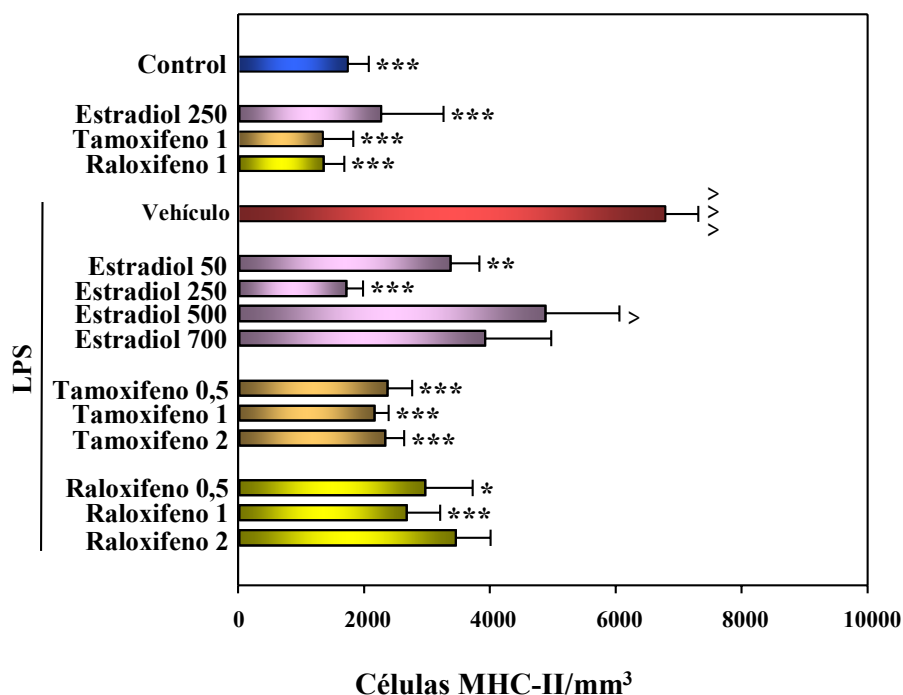


Fig. 58. Número de células inmunorreactivas para MHC-II /mm<sup>3</sup> en la sustancia blanca del cerebelo de ratas macho después de los siguientes tratamientos: vehículos para los compuestos estrogénicos y LPS (Control, n=10); estradiol 250 µg/Kg (Estradiol 250, n=4); tamoxifeno 1 mg/Kg (Tamoxifeno 1, n=4); raloxifeno 1 mg/Kg (Raloxifeno 1, n=4); LPS (LPS y Vehículo, n=16); LPS y estradiol 50 µg/Kg (LPS y Estradiol 50, n=6); LPS y estradiol 250 µg/Kg (LPS y Estradiol 250, n=5); LPS y estradiol 500 µg/Kg (LPS y estradiol 500, n=8); LPS y estradiol 700 µg/Kg (LPS y Estradiol 700, n=5); LPS y tamoxifeno 0,5 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 0,5, n=6); LPS y tamoxifeno 1 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 1, n=6); LPS y 2 mg/Kg tamoxifeno (LPS y Tamoxifeno 2, n=6); LPS y raloxifeno 0,5 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 0,5, n=4); LPS y raloxifeno 1 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 1, n=8); LPS y raloxifeno 2 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 2, n=4). Los datos mostrados son la media ± SEM. Diferencias significativas versus valores de LPS: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Diferencias significativas versus valores control: ^p<0,05; ^^p<0,001

#### 4.3.3 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas hembra, iniciando el tratamiento una semana después de la ovariectomía

En este estudio utilizamos ratas ovariectomizadas para eliminar la fluctuación de hormonas ováricas durante el ciclo estral. En un primer experimento, el tratamiento con el LPS y los compuestos estrogénicos fue iniciado una semana después de la ovariectomía.

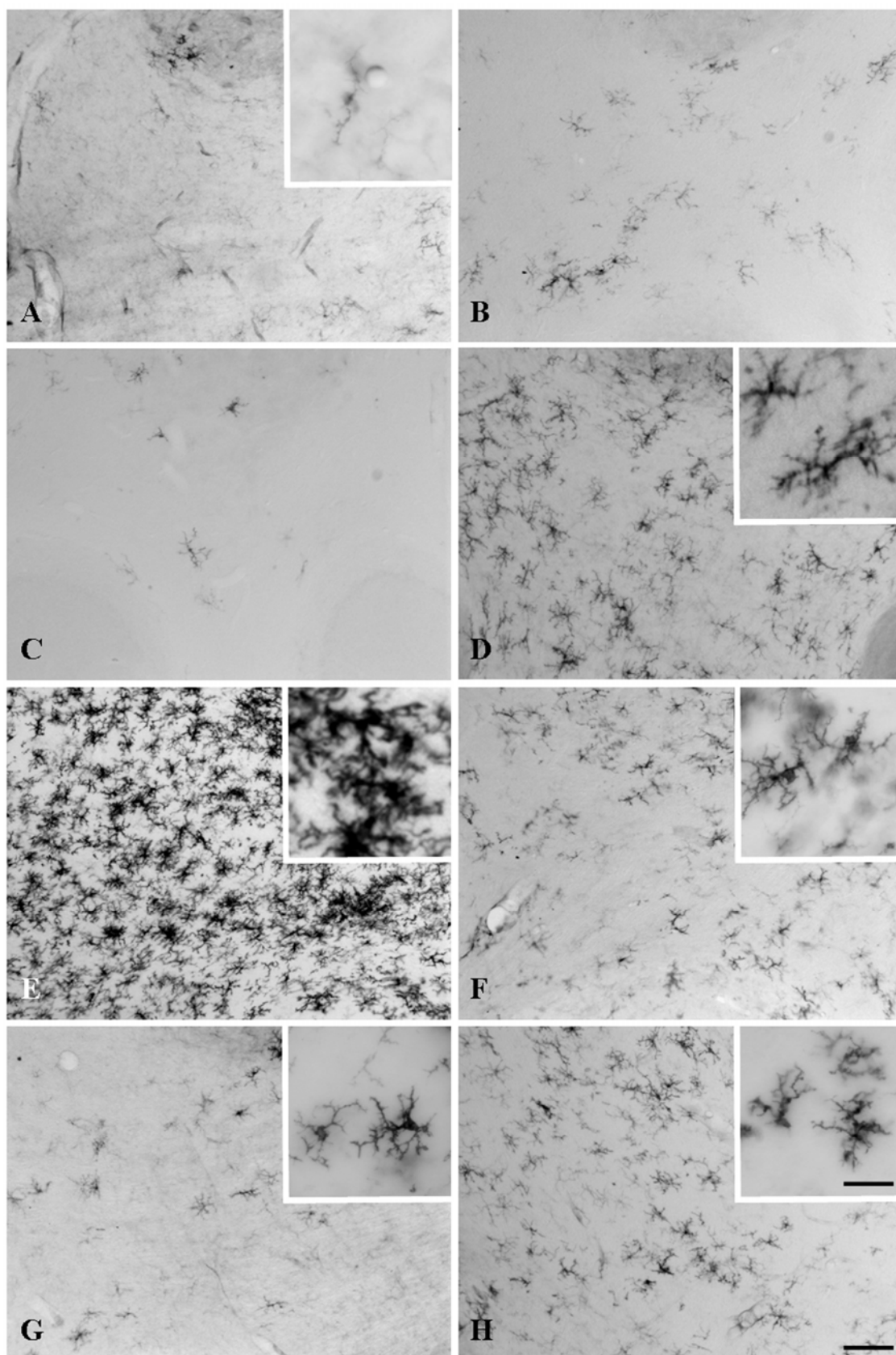
Al igual que en los machos, la administración de estradiol disminuyó de una manera dosis dependiente, el número de células MHC-II en las hembras inyectadas con LPS (Figs. 59 y 60). El estradiol también redujo la morfología reactiva de la microglía (comparar los insertos Figs. 59E y F). Sin embargo, a diferencia de los machos, la dosis

más baja de estradiol analizada (50 mg/kg) no redujo significativamente el número de células MHC-II en las ratas inyectadas con LPS, por el contrario, las dosis de 250 y 500 µg/kg disminuyeron significativamente el número de células MHC-II inmunorreactivas (Figs. 59 y 60). El estradiol, a la dosis de 250 µg/kg, no afectó significativamente a la inmunorreactividad frente a MHC-II en ratas que no fueron tratados con LPS (Figs. 59 y 60).

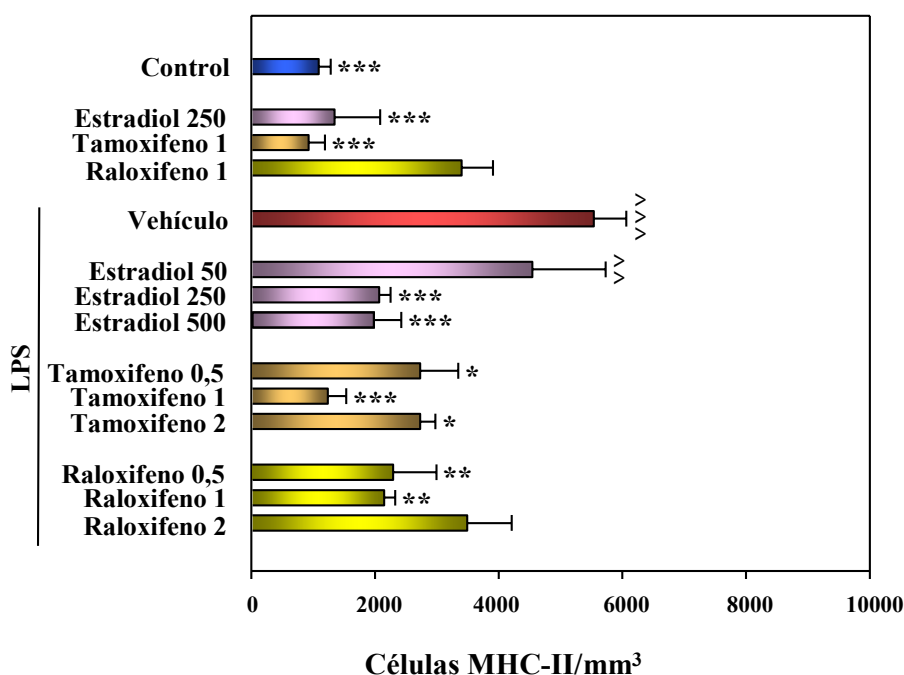
Tal y como observamos en las ratas macho, todas las dosis analizadas de tamoxifeno resultaron en una reducción significativa en la morfología reactiva de la microglía (comparar los insertos Figs. 59E y G), y en una disminución en el número de células MHC-II inmunorreactivas a valores que no fueron diferentes significativamente a aquellos de las ratas control inyectadas con los vehículos (Figs. 59 y 60). El efecto máximo fue observado con la dosis de 1 mg/kg.

El raloxifeno, a dosis de 0,5 y 1 mg/kg redujo el número de células MHC-II inmunorreactivas a los niveles del control y disminuyó la morfología reactiva de la microglía (comparar los insertos en Fig. 59E y H). Sin embargo, a una dosis mayor (2 mg/kg), el raloxifeno no modificó significativamente el número de células MHC-II inmunorreactivas en comparación a las ratas inyectadas con sólo LPS (Fig. 60).

La administración de tamoxifeno (1 mg/kg) o raloxifeno (1 mg/kg) en hembras ovariectomizadas que no fueron tratadas con LPS no afectó significativamente al número de células MHC-II inmunorreactivas en comparación a los valores control (Figs. 59 y 60). Sin embargo, el raloxifeno tuvo un moderado efecto inflamatorio, no observado en los machos, por lo que en las ratas inyectadas con raloxifeno en ausencia de LPS, las células MHC-II inmunorreactivas mostraron características de microglía reactiva, con cuerpos y procesos celulares más gruesos (comparar los insertos en Figs. 59A y D). Además, el número de células MHC-II inmunorreactivas después de la administración de raloxifeno, en ausencia de LPS, no fue diferente significativamente de los valores del grupo de LPS ni del control (Fig. 60).



**Fig. 59.** Inmunorreactividad frente a MHC-II en la sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra en las que fueron iniciados los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 semana después de la ovariectomía. Las figuras muestran imágenes representativas después de administrar los siguientes tratamientos: A, vehículos; B,  $17\beta$ -estradiol 250  $\mu\text{g/Kg}$ ; C, tamoxifeno 1 mg/Kg; D, raloxifeno 1 mg/Kg; E, LPS; F,  $17\beta$ -estradiol 250  $\mu\text{g/Kg}$  y LPS; G, tamoxifeno 1 mg/Kg y LPS; H, raloxifeno 1 mg/Kg y LPS. Los insertos muestran detalles de la morfología de las células MHC-II inmunoreactivas a gran aumento. Escala de las imágenes 100  $\mu\text{m}$ . Escala de los insertos 25  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 60.** Número de células inmunorreactivas para MHC-II /mm<sup>3</sup> en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS 1 semana después de la ovariectomía. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículos (Control, n=9); estradiol 250 µg/Kg (Estradiol 250, n=4); tamoxifeno 1 mg/Kg (Tamoxifeno 1, n=4); raloxifeno 1 mg/Kg (Raloxifeno 1, n=4); LPS (LPS y Vehículo, n=16); LPS y estradiol 50 µg/Kg (LPS y Estradiol 50, n=4); LPS y estradiol 250 µg/Kg (LPS y Estradiol 250, n=5); LPS y estradiol 500 µg/Kg (LPS y Estradiol 500, n=5); LPS y tamoxifeno 0,5 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 0,5, n=5); LPS y tamoxifeno 1 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 1, n=4); LPS y tamoxifeno 2 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 2, n=5); LPS y raloxifeno 0,5 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 0,5, n=4); LPS y raloxifeno 1 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 1, n=4); LPS y raloxifeno 2 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 2, n=4). Los datos mostrados son la media ± SEM. Diferencias significativas versus valores de LPS: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Diferencias significativas versus valores control: ^p<0,01; ^^p<0,001.

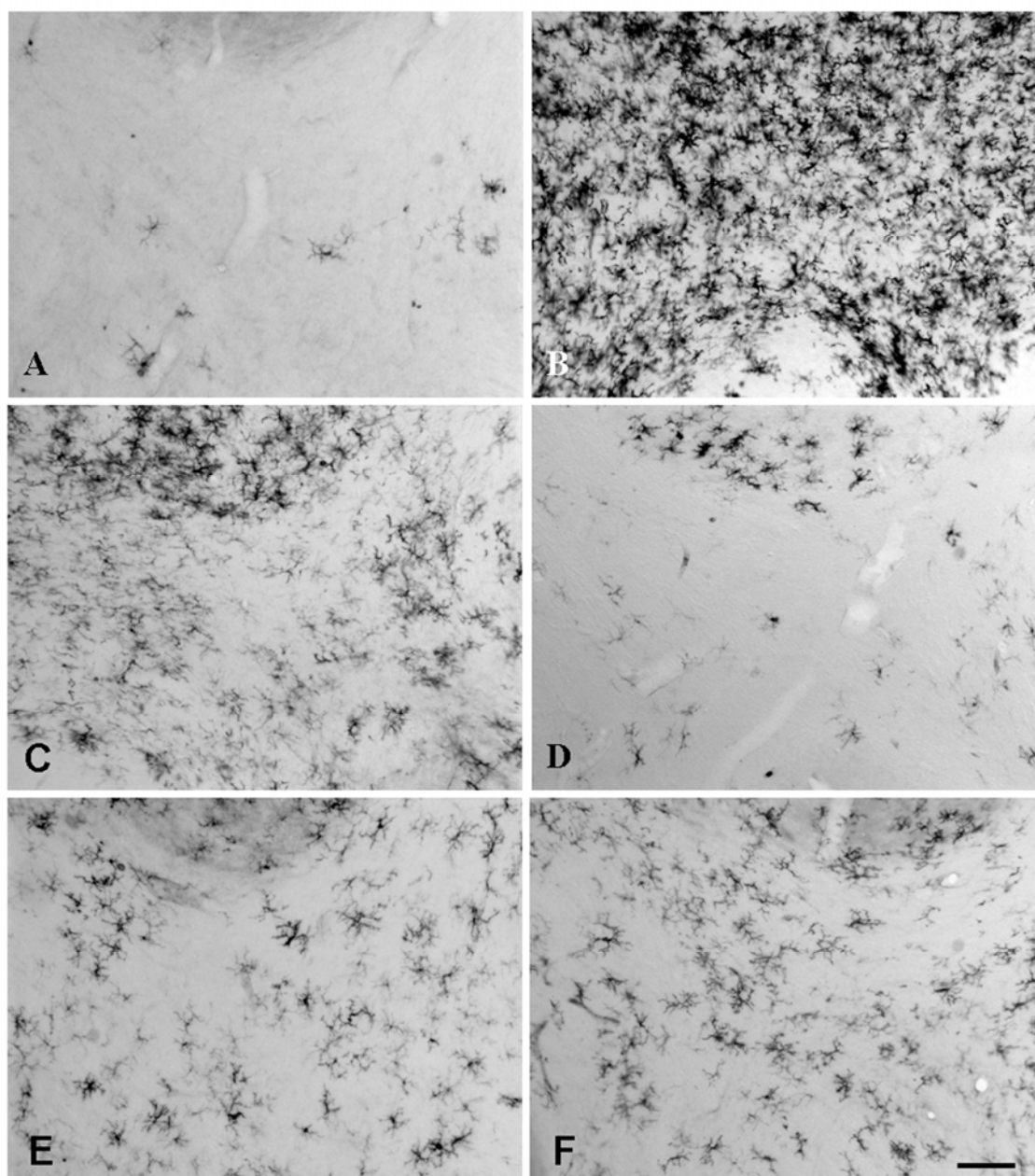
#### 4.3.4 Efectos de los compuestos estrogénicos sobre la microglía en ratas hembra, iniciando el tratamiento 1 mes después de la ovariectomía

En un segundo grupo de animales, los tratamientos con el LPS y los compuestos estrogénicos se iniciaron 1 mes después de la ovariectomía para determinar si un tiempo prolongado de privación previa de hormonas ováricas, pudiera afectar al efecto antiinflamatorio de los compuestos estrogénicos sobre la microglía (Figs. 61 y 62).

En los animales inyectados con el LPS 1 mes después de la ovariectomía, tanto el estradiol (250 mg/kg) como el tamoxifeno (0,5 y 1 mg/kg) disminuyeron el número de células inmunorreactivas para MHC-II a valores significativamente más bajos que en las ratas inyectadas con LPS sólo (Figs. 61 y 62). Tal y como observamos cuando los tratamientos fueron iniciados 1 semana después de la ovariectomía, el efecto máximo

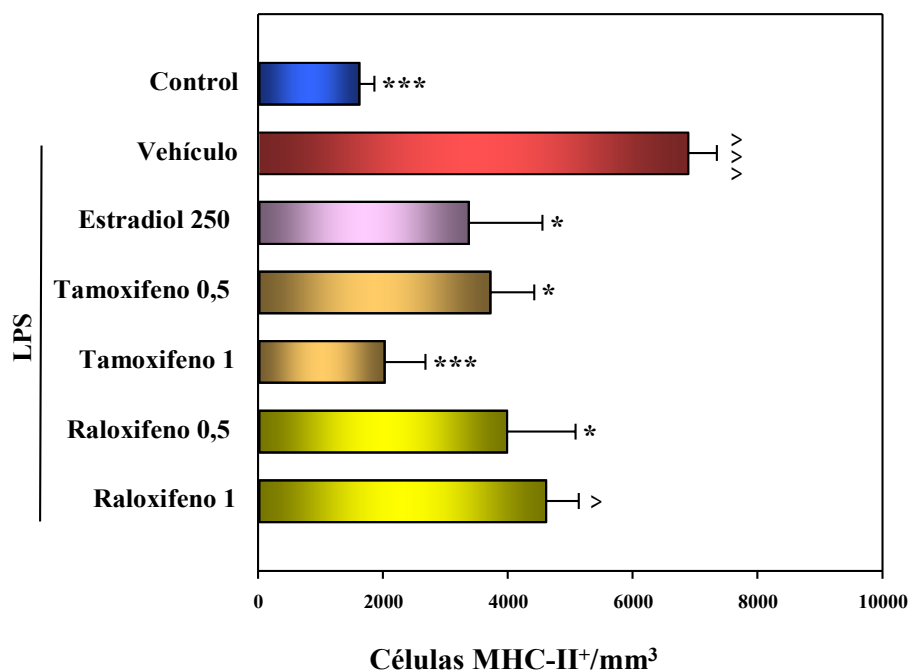
del tamoxifeno fue detectado a la dosis de 1 mg/kg. Además, la respuesta de las células MHC-II inmunorreactivas a estradiol y tamoxifeno fue similar después de 1 mes y 1 semana de ovariectomía.

El raloxifeno, a la dosis de 0,5 mg/kg, también produjo una reducción significativa en el número de células MHC-II inmunorreactivas, como observamos en las ratas hembra cuando los tratamientos fueron iniciados una semana después de la ovariectomía (Figs. 61 y 62). Sin embargo, el efecto antiinflamatorio del raloxifeno se perdió a la dosis de 1 mg/kg en animales hembra inyectadas con LPS 1 mes después de la ovariectomía. El número de células MHC-II inmunorreactivas fue significativamente mayor en los animales inyectados con LPS y raloxifeno a la dosis de 1 mg/kg que en los animales control y no fue significativamente diferente de los valores de las ratas inyectadas con LPS sólo (Fig. 62).



**Fig. 61.** *Inmunorreactividad frente a MHC-II en la sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra en las que fueron iniciados los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 mes después de la ovariectomía. Las figuras muestran imágenes representativas después de administrar los siguientes tratamientos: A, vehículos; B, LPS; C, 17β-estradiol 250 µg/Kg y LPS; D, tamoxifeno 1 mg/Kg y LPS; E, raloxifeno 0,5 mg/Kg y LPS; F, raloxifeno 1 mg/Kg y LPS. Escala 100 µm.*



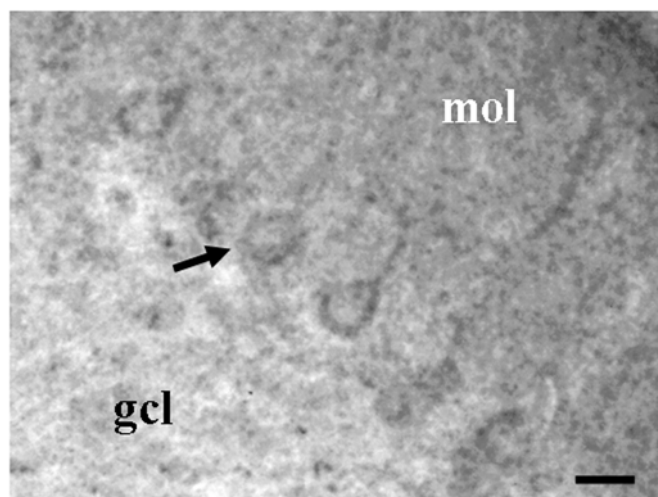


**Fig. 62.** Número de células inmunorreactivas para MHC-II /mm<sup>3</sup> en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS 1 mes después de la ovariectomía. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículos (Control, n=10); LPS (LPS y Vehículo, n=9); LPS y estradiol 250 µg/Kg (LPS y Estradiol 250, n=3); LPS y tamoxifeno 0.5 mg/Kg (LPS y Tamoxifeno 0.5, n=5); LPS y 1 mg/Kg tamoxifeno (LPS y Tamoxifeno 1, n=4); LPS y raloxifeno 0.5 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 0.5, n=4); LPS y raloxifeno 1 mg/Kg (LPS y Raloxifeno 1, n=4). Los datos mostrados son la media ± SEM. Diferencias significativas versus valores de LPS: \**p*<0,05; \*\*\**p*<0,001. Diferencias significativas versus valores control: ^*p*<0,05; ^^*p*<0,001.

#### 4.3.5 Expresión de los receptores de estrógeno en la microglía

Exploramos la posible expresión de los ERs en la microglía por inmunohistoquímica. Observamos inmunorreactividad frente al ERβ en las células de Purkinje (Fig. 63) como previamente estaba descrito en la literatura (Shughrue y cols., 1997, Price and Handa 2000). Sin embargo no fuimos capaces de detectar ninguna evidencia de colocación de la inmunorreactividad frente a ERβ con el marcador de microglía OX-42, ni en las ratas control inyectadas con vehículos, ni en las inyectadas con compuestos estrogénicos, LPS o la combinación de LPS y compuestos estrogénicos. Obtuvimos resultados idénticos con los dos anticuerpos ERβ ensayados.

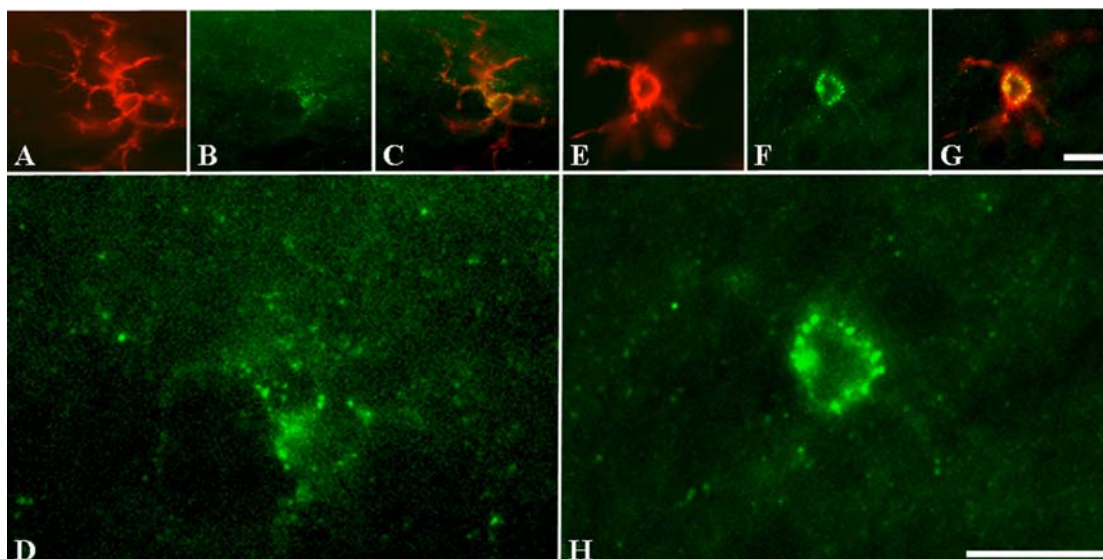




*Fig. 63. Inmunomarcaje de las células de Purkinje (flecha) empleando el anticuerpo policlonal de conejo frente a ER $\beta$ . mol, capa molecular. gcl, capa de células granulares. Escala 25  $\mu$ m.*

Por el contrario, si detectamos colocalización de la inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  y al OX-42 (Fig.64). El patrón de la inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  fue difuso en las ratas control (Fig. 64D). Sin embargo, en las ratas tratadas con LPS después de 1 semana de ovariectomía, la inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  claramente perfiló los somas celulares (Fig. 64H) y fue evidente el inmunomarcaje puntiforme frente al ER $\alpha$  en el pericarion celular y en los procesos de células inmunorreactivas frente a OX-42 (Fig. 64G). El marcaje puntiforme no fue observado cuando el anticuerpo primario frente al ER $\alpha$  fue omitido durante la incubación.

Como control de la especificidad de la señal del ER $\alpha$ , fueron empleadas secciones de ratones ER $\alpha$ KO de un estudio en el que la activación de la microglía fue inducida por una lesión con una cuchilla en la corteza cerebral y en el hipocampo. No se detectó inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  en células OX-42 inmunorreactivas en los ratones ER $\alpha$ KO (datos no mostrados).



**Fig. 64.** Colocalización de la inmunorreactividad frente al OX42 (rojo) y la inmunorreactividad frente al ERα (verde) en la sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas. A-D, rata control. E-H, rata inyectada con LPS 1 semana después de la ovariectomía. A y E, ejemplos de células OX42 inmunorreactivas. B y F, inmunorreactividad frente al ERα en los mismos campos microscópicos de los paneles A y E, respectivamente. C y G, mezcla de los canales verde y rojo que muestran puntos de colocalización (amarillo) de OX42 y ERα en el soma y procesos celulares de células OX42 inmunorreactivas. D y H, detalle a gran aumento de las células mostradas en los paneles B y F, respectivamente. La administración del LPS realizó la localización de la inmunorreactividad frente al ERα en el cuerpo celular. Escala 10  $\mu$ m.

La estimación del porcentaje de los somas OX-42 inmunorreactivos que mostraban colocalización con el ERα reveló un incremento significativo en las ratas tratadas con LPS 1 semana después de la ovariectomía ( $67 \pm 5\%$  vs  $88 \pm 3\%$  en ratas control e inyectadas con LPS respectivamente,  $p < 0.01$ ) (Fig. 65). El tratamiento con estradiol (250  $\mu$ g/kg), en ausencia del LPS, también incrementó la localización de la inmunorreactividad frente al ERα en el pericáron de las células OX-42 inmunorreactivas y el porcentaje de colocalización de los dos marcadores ( $87 \pm 0.5\%$ ,  $p < 0.01$  versus valores control). Sin embargo, el tratamiento con estradiol contrarrestó el efecto del LPS en el porcentaje de colocalización ( $73 \pm 2\%$ ;  $p < 0.01$  versus valores de LPS) (Fig. 65).

Como observamos para el tratamiento con estradiol, el tratamiento con tamoxifeno (1 mg/kg) incrementó el porcentaje de células OX-42 inmunorreactivas con inmunomarcaje frente al ERα bajo condiciones basales ( $93 \pm 1\%$ ;  $p < 0.05$  versus valores control). Sin embargo, el tamoxifeno no afectó significativamente al porcentaje de colocalización en las ratas inyectadas con LPS ( $81 \pm 8\%$ ) (Fig. 65).

El raloxifeno (1 mg/kg) no afectó significativamente al porcentaje de células OX-42 inmunorreactivas que colocalizaban con el ERα bajo condiciones basales y no

modificó significativamente la colocalización del ER $\alpha$  y el OX-42 en las ratas inyectadas con LPS (Fig. 65).

En las ratas que fueron tratadas 1 mes después de la ovariectomía se obtuvieron resultados diferentes. El porcentaje de células en las que colocalizaban el ER $\alpha$  y OX-42 no fue afectado significativamente por el LPS o por la combinación de LPS y estradiol o LPS y tamoxifeno ( $50\pm3$ ,  $37\pm5$ ,  $52\pm8$ , y  $46\pm6\%$  en animales tratados con vehículo, LPS, estradiol y LPS, y tamoxifeno y LPS respectivamente). Por el contrario, la combinación de LPS y raloxifeno indujo una disminución significativa en el porcentaje de células que colocalizaban para el ER $\alpha$  y el OX-42 respecto a los valores de los animales inyectados con vehículos ( $36\pm1\%$ ;  $p<0,01$ ). Además, el porcentaje de colocalización de la inmunorreactividad para el OX42 y el ER $\alpha$  disminuyó significativamente en los animales tratados 1 mes después de la ovariectomía ( $50\pm3\%$ ) en comparación a los animales tratados una semana después de la ovariectomía ( $67\pm5\%$ ;  $p<0,05$ ) (Fig. 65).

% ER $\alpha$ / OX-42					LPS			
TRATAMIENTO	CONTROL	ESTRAD 250	TAMOX 1	RALOX 1	VEHÍCULO	ESTRAD 250	TAMOX 1	RALOX 1
TIEMPO OVX								
♀ 1 SEM OVX	67 $\pm$ 5	87 $\pm$ 0.5	93 $\pm$ 1	79 $\pm$ 6	88 $\pm$ 3	73 $\pm$ 2	81 $\pm$ 8	77 $\pm$ 1
♀ 1 MES OVX	50 $\pm$ 3	—	—	—	37 $\pm$ 4	52 $\pm$ 8	46 $\pm$ 6	37 $\pm$ 1

*Fig. 65. Tabla resumen del porcentaje de células inmunorreactivas para ER $\alpha$  y OX-42 en la sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas, en las que se iniciaron los tratamientos con compuestos estrogénicos y LPS, 1 semana (1 SEM OVX) o 1 mes después de la ovariectomía (1 MES OVX). Vehículos (CONTROL), LPS (LPS y vehículo), estradiol 250  $\mu$ g/Kg (ESTRAD 250), tamoxifeno 1 mg/kg (TAMOX 1) y raloxifeno 1mg/kg (RALOX 1).*

#### 4.3.6 Efectos de los agonistas de los receptores de estrógeno PPT y DPN sobre la microglía

Realizamos el siguiente estudio con la finalidad de esclarecer la implicación de los ERs  $\alpha$  y  $\beta$  en la modulación de la microglía reactiva. En las ratas inyectadas con el LPS, el PPT redujo la morfología reactiva de la microglía a las dosis de 1,2 y 2,4 mg/kg. Por el contrario la dosis más baja de PPT (0,6 mg/kg) no tuvo un efecto significativo sobre el número de células inmunorreactivas para MHC-II (Fig. 66).

De las 3 dosis ensayadas de DPN (0,6, 1,2 y 2,4 mg/kg), únicamente la dosis mayor tuvo un efecto significativo sobre el número de células MHC-II inmunorreactivas en las ratas tratadas con LPS (Fig. 66).

La combinación de ambos agonistas, PPT y DPN, a las dosis de 1,2+1,2 y 2,4+2,4 mg/kg indujo un descenso significativo en el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II en las ratas que fueron tratadas con LPS. Sin embargo la dosis más baja de 0,6+0,6 mg/kg no indujo diferencias significativas (Fig. 66). El PPT o el DPN (2,4 mg/kg), no afectaron significativamente el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II en las ratas que no fueron tratadas con LPS (Fig. 66).

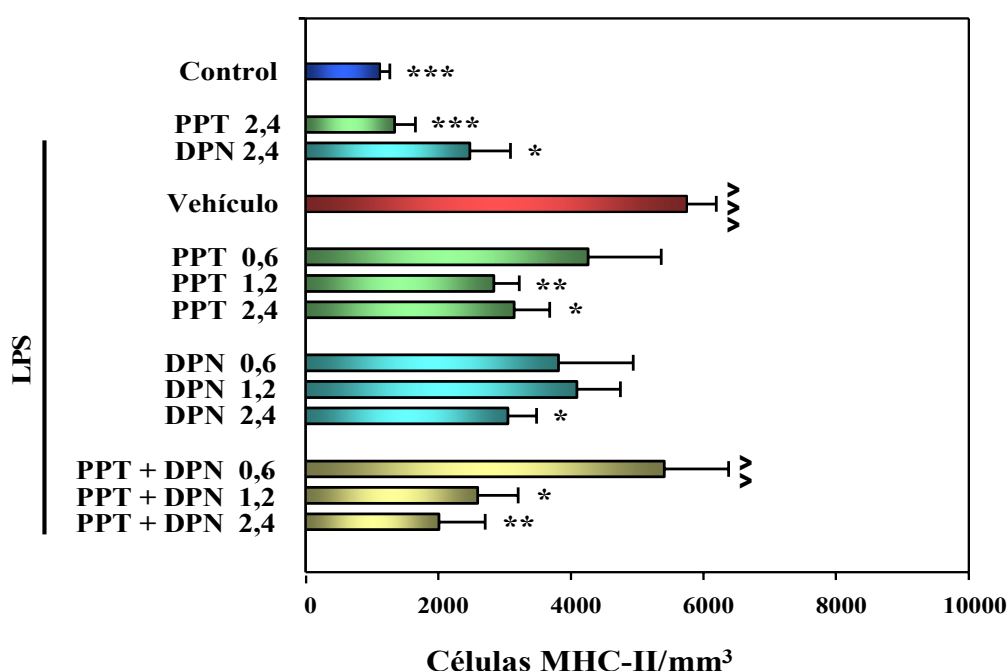


Fig. 66. Número de células inmunorreactivas para MHC-II/mm<sup>3</sup> en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hembra en las que se iniciaron los tratamientos con agonistas de los receptores de estrógenos (PPT y DPN) y LPS 1 semana después de la ovariectomía. Los tratamientos fueron los siguientes: vehículos (Control, n=8); PPT 2,4 (2,4 mg/kg, n=4); DPN 2,4 (2,4 mg/kg, n=4); LPS (LPS y Vehículo, n=8); LPS y PPT 0,6 mg/kg (LPS y PPT 0,6, n=4); LPS y PPT 1,2 mg/kg (LPS y PPT 1,2 mg/kg, n=4); LPS y PPT 2,4 mg/kg (LPS y PPT 2,4 mg/kg, n=4); LPS y DPN 0,6 mg/kg (LPS y DPN 0,6, n=4); LPS y DPN 1,2 mg/kg (LPS y DPN 1,2, n=4); LPS y DPN 2,4 mg/kg (LPS y DPN 2,4, n=4); LPS y PPT 0,6+DPN 0,6 mg/kg (LPS y PPT+DPN 0,6, n=4); LPS y PPT 1,2+DPN 1,2 mg/kg (LPS y PPT+DPN 1,2, n=4); LPS y PPT 2,4+DPN 2,4 mg/kg (LPS y PPT+DPN 2,4, n=4). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencias significativas versus valores de LPS: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Diferencias significativas versus valores control: ^p<0,01; ^^p<0,001.

## **DISCUSIÓN**

## **1. MODELO DE SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL Y DE TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA (ICV)**

### **La microglía se activa en el cerebro de ratas con sobrepeso**

La obesidad es uno de los campos más activos en la investigación biomédica, con una alta incidencia en la población de los países desarrollados. En nuestro estudio hemos abordado las alteraciones que se producen en el cerebro desde el punto de vista inflamatorio, otorgando a la microglía un papel relevante en la regulación de la homeostasis energética.

En los modelos animales de obesidad inducida por la dieta, así como en los humanos obesos, las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y el TNF $\alpha$  (Greenberg y Obin, 2006; Shoelson y cols., 2006) y los niveles de leptina se encuentran incrementados en la circulación y en los tejidos metabólicamente activos como el hígado y el tejido adiposo (Zhang y cols., 1994; Frederich y cols., 1995; West y York, 1998). Las citoquinas pueden ejercer un potente efecto endocrino/neuroendocrino desencadenando cambios en la homeostasis energética (Guijarro y cols., 2006). Recientemente se ha demostrado que en el hipotálamo de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas, hay una activación de la respuesta inflamatoria en la que se produce un aumento de la expresión de los genes TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la IL-6, acompañado del incremento de células de microglía que expresan el receptor tipo Toll-4 (TLR-4) y F4/80 (Milanski y cols., 2009).

En el presente trabajo, hemos detectado un marcado incremento en el número de células MHC-II inmunorreactivas en el cerebro de las ratas con sobrepeso. La expresión de MHC-II es considerada como un marcador fidedigno de activación microglial (Ladeby y cols., 2005) y la inmunoreactividad frente a MHC-II es prácticamente indetectable en la microglía en reposo. En contraposición al estudio de Milanski y cols., en nuestro estudio los animales no estaban expuestos a un cambio de dieta, indicando que la activación de la microglía hipotalámica en nuestro estudio era el resultado de algún cambio derivado del sobrepeso y no de la dieta.

En el hipotálamo de las ratas con sobrepeso se produjo un aumento notable y estadísticamente significativo de la microglía inmunorreactiva frente a MHC-II en la

EM, el VMN, y el OX. Sin embargo en los núcleos PVN, DMN y Arc, a pesar de presentar un aumento en las células MHC-II, la diferencia con los animales controles no fue significativo. Las células de microglía activadas fueron particularmente abundantes en la sustancia blanca del cerebro.

Existen determinadas áreas cerebrales más susceptibles al influjo de moléculas proinflamatorias de la sangre debido a la falta de BBB, como es el caso de la EM, donde nosotros hemos encontrado una alta densidad de células MHC-II inmunorreactivas. La EM, está formada por sustancia blanca predominantemente, donde podemos encontrar glía residente entre los axones neurosecretorios (Cheunsuang y Morris, 2005), vasos sanguíneos y tanicitos (Rodríguez y cols., 1979). Este CVO, es un área altamente vascularizada y desprovista de BBB, estando expuesta a la acción de agentes circulantes proinflamatorios como la IL-1, la IL-6, el TNF $\alpha$  y la leptina, cuyos niveles plasmáticos encuentran elevados en la obesidad (Greenberg y cols., 2006; Shoelson y cols., 2006). Esta podría ser la causa de una mayor activación microglial en la EM de los animales con sobrepeso.

Hay autores que contemplan a la EM y la zona más ventral del Arc (vm-Arc) como un único complejo de integración de la información circulante y metabólica, a través de sus conexiones recíprocas con áreas viscerosensoriales cerebrales y los CVOs (Yi y cols., 2006). Los vasos sanguíneos localizados en el vm-Arc presentan una alteración en la BBB, ya que no presentan algunos de los marcadores típicos, como el antígeno de la barrera endotelial (EBA) y el receptor de transferrina (TfR), lo que representa una vía de entrada para las sustancias circulantes que estimulan e inhiben a las neuronas que regulan la ingesta y el peso corporal (Norsted y cols., 2008). Este tipo de microvasos permeables forman parte del plexo subependimal de la EM, que irriga exclusivamente el vm-Arc (Ciofi y cols., 2009). En un estudio en el que se inyectó como trazador la toxina del cólera B conjugada con un fluoróforo (CTB) en el vm-Arc y la capa subependimal de la EM (seEM), se detectó que varias regiones mostraban una interacción recíproca con el vm-Arc y la seEM: el Sch, el PVN, el núcleo preóptico, el DMN, el VMN y otros CVOs como el SFO, el OVLT, el AP y el NTS (Yi y cols., 2006). Así pues, en la EM, debido a su carencia de BBB y a su alta vascularización, la microglía podría estar activada en las ratas con sobrepeso por el incremento de agentes circulantes proinflamatorios.

Encontramos también microglía reactiva en el VMN, que ha sido considerado durante mucho tiempo el centro regulador de la saciedad por excelencia (Kennedy, 1950 y Brobeck, 1956) y que interviene en el control de la ingesta (Schwartz y cols., 2000; Woods y cols., 2000). La estimulación eléctrica del VMN produce una alteración en el patrón de comportamiento alimenticio, produciéndose una supresión de la ingesta y del sueño (Hetherington y Ranson, 1942; Anand y Brobeck, 1951 a y b; Hoebel, 1971) o reacciones aversivas tales como, excitación motora intensa, la acción de fuga y de ataque (Oomura, 1981; Bernardis, 1985). Las lesiones en el VMN provocan efectos opuestos: hiperfagia, obesidad e hiperemocionalidad (Hetherington y Ranson, 1942). Estudios en humanos evidencian un gran aumento de la actividad del VMN durante la alimentación.

Además del VMN, las ratas con sobrepeso también presentaron una gran cantidad de células de glía en el OX. En relación con esta observación, es interesante que un estudio sobre la gliogénesis postnatal en el nervio óptico de ratas puso en evidencia que la microglía inmunorreactiva para lipocortina 1 (LC1) representa en la rata adulta el 12% de la glía del nervio óptico cercana al quiasma óptico (Zhang y McKanna, 1997), una región en la que se concentra una densidad alta de células de microglía. También se ha descrito que determinadas retinopatías ópticas en las que se produce una ruptura de la BBB en el nervio óptico (Sklar y cols., 1996), como la neuritis isquémica óptica anterior, están asociadas con obesidad, sobrepeso y diabetes (Rodríguez-Gaspar y cols., 2010). Nuestros resultados apoyan la posibilidad de que en situaciones de sobrepeso y obesidad se esté produciendo un aumento de los factores circulantes capaces de activar a la microglía del OX.

El cerebelo es un área cerebral especialmente sensible a los mediadores inflamatorios circulantes o a agentes proinflamatorios como el LPS, además de desempeñar un papel relevante en la integración somática-visceral del control de la ingesta y motivación por el alimento, a través de conexiones recíprocas entre el cerebelo y el hipotálamo (Zhu y cols., 2008). Por lo tanto, es comprensible que en nuestro modelo de obesidad, además de hallar microglía reactiva en diversos núcleos del hipotálamo, también la encontremos en el cerebelo. Varios estudios realizados sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, muestran que la microvasculatura del



cerebelo parece ser más sensible a la acción inflamatoria sistémica inducida por sustancias nocivas como el LPS o el ácido valproico (VPA) (Vorbrodty y cols., 2005). Además, en un estudio realizado sobre la distribución de las poblaciones gliales en el cerebro de ratas adultas se ha demostrado que el cerebelo se encuentra entre las áreas cerebrales con una densidad microglial más elevada (Savchenko y cols., 2000).

Ya que la microglía activada representa una fuente de citoquinas en el SNC (Schöbitz y cols., 1994; Gehrmann y cols., 1995; Benveniste, 1997; Sternberg, 1997), el incremento de IL-6 en la sustancia blanca del cerebelo de las ratas con sobrepeso podría ser debido a la activación de la microglía.

### **La leptina induce la activación microglial hipotalámica**

En el presente estudio hallamos que la microglía hipotalámica estaba activada en un modelo de sobrepeso, donde distintos factores circulantes y centrales se encuentran modificados, incluyendo la leptina circulante.

Se ha propuesto a la leptina como un nexo entre el estado nutricional y las funciones neuroendocrinas e inmunes (Bjørbaek y Kahn, 2004; La Cava y Matarese, 2004; Guijarro y cols, 2006; Dixit, 2008). La leptina puede actuar como un inductor de la fase aguda temprana de la inflamación, como la IL-1 y la IL-6, ya que se produce un incremento de sus niveles durante la inflamación, y es capaz de modular la respuesta inmune innata y adaptativa (Loffreda y cols., 1998; Sánchez-Margalet y cols., 2003). Esta hormona es capaz de estimular a la microglía *in vitro*, induciendo la producción de IL-1 $\beta$  y TNF  $\alpha$  (Pinteaux y cols., 2007) y a las células de microglía de la línea tumoral BV-2, activando la producción de la IL6 (Tang y cols, 2007).

Por lo tanto, la leptina podría estar jugando un papel relevante en la inducción de la activación de la microglía en el SNC de animales con sobrepeso, que tienen niveles elevados de esta hormona. Por esta razón, realizamos un tratamiento crónico de leptina, por administración *icv*, y analizamos posteriormente la inmunorreactividad para MHC-II en el hipotálamo. Este modelo presenta la ventaja de que las ratas no son obesas y no presentan los cambios corporales y circulantes que presentaban las ratas con sobrepeso, lo que nos permite ver más claramente si la leptina, podría estar directamente implicada en la activación de la microglía hipotalámica.

En este estudio encontramos células MHC-II inmunorreactivas en el hipotálamo de las ratas tratadas con leptina *icv*. Algunas de estas células presentaban un soma esférico con múltiples proyecciones muy finas y cortas; otras un soma alargado y procesos gruesos y retraídos y un tercer grupo de células eran ameboides, sin proyecciones. Los distintos fenotipos observados podrían representar distintos estadios de activación de la microglía o de otros tipos celulares que también expresaran el marcador MHC-II, como los macrófagos residentes del SNC (Ford y cols., 1995). Estos últimos constituyen una minoría y suelen dividirse en dos tipos, los macrófagos perivasculares, que están situados junto a la lámina basal de los vasos de pequeño calibre, con un fenotipo fusiforme (Graeber y cols., 1992; Flaris y cols., 1993; Fabriek y cols., 2005; Kim y cols., 2006) y los macrófagos de las meninges, de fenotipo redondeado, presentes en la dura madre, las leptomeninges y los plexos coroideos (McMenamin, 1999). Por otro lado, no podemos descartar que la administración de leptina *icv* sea capaz de alterar la permeabilidad de las barreras que regulan la entrada celular: la BBB en el parénquima del SNC, el líquido cefalorraquídeo en los plexos coroideos, o la barrera de tanicitos situada alrededor de los CVOs, permitiendo el acceso de leucocitos al tejido nervioso, como los monocitos, que se diferencian en macrófagos en el parénquima cerebral y también pueden presentar en la superficie el MHC-II (Engelhardt, 2006; Prendergast y Anderton, 2009). En todo caso, nuestros resultados sugieren que la leptina ejerce un efecto directo sobre la activación y/o diferenciación de las células presentadoras de MHC-II, induciendo la activación de las células del sistema inmune innato en el cerebro.

El VMN fue otra de las regiones hipotalámicas con un cambio significativo en el número de células de microglía activada en los animales con sobrepeso. Este núcleo posee una alta densidad de receptores de leptina, particularmente en su porción dorsomedial (Schwartz y cols., 1996; Elmquist y cols., 1997a y 1998; Hakansson y cols., 1998; Baskin y cols., 1999; Masaki y cols., 2003), indicando que la leptina puede actuar directamente en el VMN. Además, hemos de tener en cuenta que es en la EM y el Arc en donde se encuentran concentraciones más elevadas de los receptores de leptina en el cerebro de la rata (Banks y cols., 1996; Schwartz y cols., 1996; Zamorano y cols., 1997). Además, los astrocitos de la EM pueden capturar moléculas de la circulación y muchos de ellos expresan los receptores de leptina (Cheunsuang y Morris, 2005).

Otra cuestión importante en relación al análisis de nuestros resultados, es la posible regulación del estado inflamatorio central por la acción de los neuropéptidos hipotalámicos involucrados en el control de la ingesta, cuyos niveles se encuentran alterados en la obesidad. Por ejemplo, PACAP, un neuropéptido anorexigénico liberado predominante en el VMN (Segal y cols., 2005; Kurrasch y cols., 2007) y que parece ser un mediador importante en los efectos centrales de la leptina en el balance energético (Hawke y cols., 2009).

Al PACAP se le han atribuido recientemente propiedades antiinflamatorias (Gadea y cols., 2003). Este neuropéptido, así como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) es capaz de inhibir la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y NO en cultivos de microglía estimulados con LPS (Delgado y cols., 2003). Según estas evidencias, podríamos pensar que la alteración de los niveles de neuropéptidos como el PACAP en la obesidad, también podría afectar a la activación de las células de microglía.

El efecto de la leptina podría producirse directamente sobre la microglia, o a través de la estimulación de otro tipo celular. En situaciones en las que haya un exceso de leptina como ocurre en la obesidad, se promueve la expresión de POMC, que se escinde postraduccionalmente en péptidos llamados melanocortinas (Seeley y cols., 2004; Cone, 2005), entre ellas la  $\alpha$ -MSH y la  $\beta$ -MSH (Harmer y cols., 2004; Millington, 2007). La  $\beta$ -MSH no se produce fisiológicamente en los roedores (Millington y cols., 2001; Coll y cols., 2004). Sólo se han visto sus acciones centrales en humanos, aunque también se cree que desempeña un papel importante en la inhibición de la ingesta (Lee y cols., 2006). La  $\alpha$ -MSH, ejerce su acción anorexigénica a través de los receptores de melanocortina MC3 y MC4 (MC3-R y MC4-R) (Huszar y cols., 1997; Chen y cols., 2000; Harrold y cols., 2003). Estos receptores se han encontrado también en el VMN (Gantz y cols., 1993; Mountjoy y cols., 1994; Lindblom y cols., 1998), por lo que parece que las neuronas POMC del Arc activan a las neuronas del VMN para disminuir la ingesta.

Se ha demostrado que la  $\alpha$ -MSH posee efectos antiinflamatorios *in vivo* e *in vitro* (Catania y Lipton, 1993; Lipton y Catania, 1997) y antipiréticos, reduciendo la fiebre y la inflamación en modelos de inflamación aguda, crónica y sistémica (Lipton y cols., 1994; Tian y cols., 2004). Además, la  $\alpha$ -MSH tiene efectos sobre la microglía. Se

ha descrito la acción antiinflamatoria de las melanocortinas, en células de microglía activadas por el LPS e INF- $\gamma$ . Tanto la  $\alpha$ -MSH como la ACTH, redujeron la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, y NO $_2^-$ . Además se observó que las células de microglía en presencia de LPS e INF- $\gamma$  fueron capaces de liberar  $\alpha$ -MSH, lo que sugiere una función autocrina en estas células (Delgado y cols., 1998). Además, Lindberg y cols., 2005 observaron en la línea celular microglial humana CHME3, que la hormona  $\alpha$ -MSH producía un incremento de la liberación de IL-6 a través de los receptores MC3-R o MC5-R. Así, la leptina también podría activar a la microglía a través de la modulación de la producción de las melanocortinas.

Por otro lado, en adición a la hiperleptinemia, la obesidad es concomitante frecuentemente con la hiperinsulinemia e hiperglicemia (Kopelman, 2000). Las concentraciones elevadas de insulina o glucosa en el plasma producen elevaciones significativas de los niveles de insulina o glucosa en el líquido cefalorraquídeo (CSF) (Ono y cols., 1983; Schwartz y cols., 1990).

Se ha descrito que una concentración elevada de glucosa es capaz de activar a la microglía de rata, estimulando la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS), que lleva a la estimulación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) permitiendo la transcripción de quimioquinas y citoquinas (Quan y cols., 2007). Además, en un modelo de diabetes experimental en ratas, por la administración de estreptozotocina, se ha observado que la microglía está activada en el SO, lo cual podría estar relacionado con la neurodegeneración diabética (Klein y cols., 2004). La activación de la microglía también se la ha relacionado con el comienzo y desarrollo de la neuropatía en la retina de ratas diabéticas (Rungger-Brandle y cols., 2000).

Por lo tanto, la activación de la microglía que hemos observado en el hipotálamo tal vez esté respondiendo a algunos de los indicadores del estado energético periféricos como la glucosa, la leptina u otras citoquinas, cuyos niveles fluctúan en la obesidad. Por lo tanto, la microglía podría participar junto a las neuronas hipotalámicas en la integración de la información de los niveles de glucosa sanguíneos y del ambiente inflamatorio periférico, mediando indirectamente en la función que el VMN desempeña en la respuesta del sistema nervioso autonómico, ya que tanto el simpático como el parasimpático, se encuentran alterados con la obesidad (Scheurink y cols., 1996).

En resumen, el fenómeno proinflamatorio en el SNC de las ratas con sobrepeso, en particular en el VMN, el OX, la EM y el cerebelo, puede ser una acción directa o indirecta de la leptina o de otras citoquinas proinflamatorias circulantes o liberadas en el tejido nervioso. Aunque el mecanismo de este fenómeno no está totalmente esclarecido, parece que la leptina está involucrada en él. Nuestros resultados establecen, por lo tanto, un enlace importante entre un acontecimiento común, como es la sobrealimentación y la generación de un fenómeno inflamatorio microambiental, en varios núcleos anatómicos involucrados en el control de las funciones metabólicas.

### **El sobrepeso y la leptina *icv* causan variaciones en los niveles de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$ en el cerebro**

La expresión constitutiva de citoquinas, aunque a bajos niveles, ha sido demostrada en la mayoría de los tipos celulares del cerebro y del eje HPA (Turnbull y Rivier, 1999). Las citoquinas en estos tipos celulares suelen mostrar una rápida regulación al alza en respuesta a una lesión y a la inflamación. En el tejido nervioso de roedores, se ha detectado que la mayor densidad de receptores de citoquinas se encuentra en el hipocampo y en el hipotálamo (Vitkovic y cols., 2000). Además, los receptores de citoquinas están también ampliamente expresados en las células de la hipófisis anterior (Ray y Melmed, 1997; Turnbull y Rivier, 1999), reforzando aun más su posible papel en el control endocrino.

La microglía activada es capaz de liberar citoquinas, como la IL-1 $\beta$ , el CTNF, el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y otros miembros de la familia de citoquinas gp130, como el LIF. Estas citoquinas participan en el control neuroendocrino. Por ejemplo, son capaces de estimular a las neuronas que producen el factor neuroendocrino de CRH (Berkenbosch y cols., 1987; Sapolsky y cols., 1987), lo que conduce a la activación de la hormona ACTH y a la liberación de esteroides adrenales (Barbanel y cols., 1990; Rivest y cols., 1992). La estimulación del eje HPA tiene un gran impacto en la regulación de la respuesta inmune, ya que se liberan glucocorticoides antiinflamatorios. De este modo las citoquinas pueden antagonizar su propia acción proinflamatoria (Auphan y cols., 1995; Scheinman y cols., 1995).

La IL-6 y otros miembros de la familia de citoquinas gp130, como el LIF, son capaces de inducir proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3) que controlarían la activación del eje HPA inducido por citoquinas (Hilton y cols., 1998; Nicholson y Hilton, 1998). De esta forma la IL-6, que desempeña un papel relevante en el control metabólico, sería también un mediador de la interacción entre el sistema inmune y el endocrino (Wallenius y cols., 2002a, b; Wallenius y cols., 2003).

Por otra parte, se sabe que la microglía es capaz de producir IL-6 por la acción de otras citoquinas como la IL-1 y el TNF $\alpha$  (Benveniste y cols., 1990; Ivashkiv, 1996; Taga y Kishimoto., 1997) o por el efecto de la leptina (Tang y cols., 2007). En la obesidad, la acción de la leptina o de elevadas concentraciones de factores proinflamatorios periféricos, podrían estar induciendo la activación de la microglía, la cual iniciaría la producción de citoquinas involucradas en el control homeostático, como por ejemplo, el LIF, el CTNF, la IL-1, el TNF- $\alpha$  o la IL-6, contribuyendo así al mecanismo de regulación de la ingesta.

La función de la IL-6 en la EM podría estar ligada con la modulación de la secreción de péptidos neuroendocrinos al sistema hipófiso-portal (Spinedi y cols., 1992; Vallières y Rivest, 1999). Se ha sugerido que los efectos neuroendocrinos de la IL-6 podrían producirse por un incremento en la síntesis de prostaglandinas a nivel de la EM (Lyson y McCann, 1992). También, la IL-1 $\beta$ , otra citoquina producida por la microglía (Pinteaux y cols., 2007), incrementa la actividad dopaminérgica del hipotálamo medio basal para producir sus efectos neuroendocrinos (Abreu y cols., 1994). La administración en la EM de IL-1, IL-6 o de TNF- $\alpha$  induce un incremento en la CRH y la ACTH y una disminución en la secreción de las hormonas de la hipófisis (Sharp y cols., 1989; Matta y cols., 1992).

La IL-6 se expresa constitutivamente en determinadas regiones del SNC, como el hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo (Schöbitz y cols., 1992 y 1993; Gadiant and Otten, 1994) y está involucrada en los mecanismos de coordinación metabólica, comportamiento y cambios neuroendocrinos no solo durante la enfermedad sino también bajo condiciones fisiológicas, desempeñando un papel importante en la regulación de la homeostasis energética en roedores (Wallenius y cols., 2002a,b;

Wallenius y cols., 2003). Trabajos anteriores han demostrado que los ratones deficientes en IL-6 desarrollan obesidad en la edad madura, que es revertida por el reemplazamiento con la IL-6 (Wallenius y cols., 2003). Además, la administración de IL-6 *icv* produce un incremento del gasto energético y una pérdida de tejido graso en ratas (Wallenius y cols., 2002b). En humanos se ha encontrado que los niveles de la IL-6 en el líquido cefalorraquídeo se correlacionan inversamente con la obesidad más severa, por lo que es posible que niveles endógenos de IL-6 bajos estén contribuyendo a la obesidad en humanos (Stenlöf y cols., 2003).

Además de la IL-6 sintetizada localmente en el cerebro, la IL-6 periférica también puede actuar en el sistema nervioso. En la literatura se ha descrito que las citoquinas circulantes de la sangre pueden atravesar la BBB y entrar en el SNC por un sistema de transporte saturable (Banks y cols., 1995). La mayor parte de la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo. En la obesidad se produce un incremento de la síntesis de adipoquinas, entre ellas la IL-6 (Greenberg y Obin, 2006; Shoelson y cols., 2006), que permite la señalización de una serie de acontecimientos en cascada en el SNC que modulan la respuesta neuronal (Rivest y cols., 2000). Por ejemplo, la IL-6 es necesaria para la estimulación prolongada de la actividad neural durante la endotoxemia (Vallières y Rivest, 1999) y puede contribuir a la regulación del HPA (Raber y cols., 1997), estimulando la liberación de ACTH y glucocorticoides, mediante la activación de neuronas del PVN, que controlan el HPA (Fukata y cols., 1989, Lyson y McCann, 1991).

Las acciones centrales y periféricas de la IL-6 están mediadas por su receptor de membrana, el IL-6R $\alpha$ , el cual se expresa en núcleos hipotalámicos que regulan el metabolismo (Yamasaki y cols., 1988; Schobitz y cols., 1993; Shizuya y cols., 1998). La capacidad de modulación del IL-6R puede cambiar bajo diferentes condiciones; en este contexto, Saito y cols., en 1992, encontraron que la IL-6 regula al alza su propio receptor en pocas horas en el hígado de ratones. Probablemente, las variaciones en la IL-6 y su receptor que ocurren en el cerebro sean mecanismos para evitar la acción incontrolada de las citoquinas en este órgano (Nesbitt y Fuller, 1992; Zohnhöfer y cols., 1992; Dittrich y cols., 1994).

Partiendo de las premisas de que la microglía es capaz de producir IL-6 en respuesta a un estímulo proinflamatorio o a la leptina, como demostramos aquí, y de

que la IL-6 está implicada en el control metabólico, analizamos los niveles de la IL-6 y su receptor en las ratas con sobrepeso y en las tratadas con leptina *icv*, para posteriormente analizar la distribución del IL-6R $\alpha$ .

Tanto en el hipotálamo como en el cerebelo de las ratas con sobrepeso observamos un incremento significativo de los niveles de la IL-6, por lo que parece que el aumento de leptina o citoquinas circulantes en la sangre, generado por el sobrepeso, pueda estar actuando en las células productoras de IL-6 del cerebro, entre ellas la microglía, que, como hemos comprobado en nuestro trabajo *in vitro*, se activa, sintetizando IL-6 y regulando al alza los niveles del IL-6R $\alpha$ , en respuesta a leptina.

El aumento de los niveles de la IL-6 en el hipotálamo podría constituir un mecanismo involucrado en la reducción de la ingesta excesiva relacionada con el sobrepeso.

En el cerebelo, se ha relacionado a la IL-6 con ataxia y alteraciones en la fisiología de las neuronas de Purkinje en ratones transgénicos GFAP-IL-6 (Gruol y Nelson, 2005). Además, el cerebelo está involucrado en el control de la motivación por el alimento (Ball y cols., 1974; Zhu y cols., 2008). Se ha descrito que la producción de la IL-6 interviene como un mecanismo temprano en la alteración de la motivación por el alimento en condiciones inflamatorias en ratones (Sakić y cols., 1997). Según estas evidencias, la IL-6 en el cerebelo, podría estar involucrada en la motivación por el alimento y la regulación del comportamiento alimenticio en las ratas con sobrepeso.

En cuanto a la respuesta generada ante el tratamiento crónico con la leptina *icv*, observamos una disminución de los niveles totales de la IL-6 y sin embargo, observamos un aumento de la proteína total del IL-6R $\alpha$ . Según estos resultados parece que la leptina directa o indirectamente, está mediando la regulación de los niveles de la IL-6 y su receptor. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que muestran que la leptina (Tartaglia y cols., 1995) y otras citoquinas de la familia de la IL-6 como, el CNTF, el LIF, el OSM, la interleuquina-11 (IL-11) y la CT-1 (Baumann y cols., 1996; Taga y Kishimoto, 1997), son capaces de regular al IL-6R.

En el cerebro, la expresión de la IL-6 es inducida por otras citoquinas como la IL-1 y el TNF $\alpha$  (Benveniste y cols., 1990; Ivashkiv, 1996; Taga y Kishimoto., 1997). La



IL-1 es capaz de modular también al LIF en células de Schwann (Carlson y cols., 1996; Carlson y Hart, 1996). Estudios recientes han demostrado que la IL-1 y el TNF $\alpha$  pueden inhibir la señalización de citoquinas pleiotrópicas tales como la IL-6 y la IL-10. La inhibición de la señalización de la IL-6 parece que está mediada por la p38 de la subfamilia de proteína quinasas activadas por el estrés, lo que sugiere que tanto citoquinas como agentes estresantes (IL-1, TNF $\alpha$ , receptores tipo Toll (TLRs) y receptores Fc) pueden modular la señalización de JAK-STAT inducida por citoquinas pleiotrópicas como la IL-6 (Ahmed e Ivashkiv, 2000; Ahmed y cols., 2002). Además, se ha visto que la leptina es capaz de inducir la producción de citoquinas en distintos tipos celulares; IL-6 y TNF $\alpha$  en monocitos circulantes humanos (Santos-Álvarez, 1999), IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$  en cultivos primarios de microglía (Tang y cols., 2007; Pinteaux y cols., 2007; Lafrance y cols., 2010). En macrófagos murinos la leptina aumenta la expresión de quimoquinas (Kiguchi y cols., 2009) y la administración intravenosa de leptina eleva los niveles de ARNm de IL-6 y de la proteína quimotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en el tejido adiposo mesentérico de rata (Allman y cols., 2009). Basándonos en estos trabajos, podríamos hipotetizar que el tratamiento con la leptina *icv* está generando una respuesta inflamatoria que afecta a la activación microglial y quizá a la de otras células, y en la que se pueden estar generando citoquinas, capaces de regular a la baja los niveles de la IL-6, y a su vez, modular al alza los niveles de su receptor, lo que permitiría la modulación del proceso inflamatorio.

En este estudio también hemos analizado el efecto de la leptina en el cerebelo, donde parece que la respuesta inflamatoria es diferente a la del hipotálamo, y en la que no se produjeron cambios en la IL-6, aunque sí encontramos disminuidos los niveles de su receptor. La diferencia en la expresión del ObRb podría estar contribuyendo a tales diferencias, ya que la expresión del ObRb es mayor en el cerebelo que en el hipotálamo (Bjørnbæk y cols., 1998; Mercer y cols., 1998). Por lo tanto, la leptina en el cerebelo parece tener un efecto inmunomodulador diferente al que produce en el hipotálamo.

## **La distribución del IL-6R $\alpha$ sufre alteraciones en el cerebro de las ratas con sobrepeso**

Basándonos en el incremento observado en los niveles de la IL-6 y de su receptor en el cerebro de las ratas con sobrepeso, decidimos analizar la distribución anatómica del IL-6R $\alpha$  en el hipotálamo y el cerebelo.

En el estado basal, y coincidiendo con los estudios previamente descritos (Schöbitz y cols., 1992 y 1993; Gadiant y Otten, 1993 y 1994; Vallières y Rivest, 1997), encontramos inmunorreactividad frente al IL-6R $\alpha$  en algunos CVOs como el MPO y la EM y en áreas hipotalámicas como el Sch, el SO, el PVN, el VMN, el DMN, el Pe, el Arc, la ZI, el DA y el LH.

Detectamos en general, una disminución de la intensidad del inmunomarcaje del IL-6R en diversas áreas hipotalámicas de las ratas con sobrepeso en comparación con las ratas controles. El marcate frente a IL-6R $\alpha$  se localizó principalmente en neuronas y con menos frecuencia en células de la glía, en el soma celular, con una distribución puntiforme, en algunas de las proyecciones y terminales neuronales. En concreto el DA, experimentó cambios más evidentes que el resto de regiones, presentando una disminución en la densidad neuronal y una distribución diferente comparado con el estado basal. Una posible explicación, es que la disminución del número de células que presentan el IL-6R $\alpha$  podría estar relacionado con la función que desempeñan las neuronas de DA en el control homeostático. La DA es considerada una subregión del DMN (Paxinos y Watson, 1997) y las neuronas del Arc y DMN son las que principalmente producen el NPY (Bi y cols., 2003). Este péptido posee diversas funciones fisiológicas (Colmers y Wahlestedt, 1993), entre ellas, como se ha mencionado arriba, está el control de la ingesta y del peso corporal. De hecho, la administración central de NPY causa un fuerte incremento de la ingesta y del peso y si se administra crónicamente puede llegar a inducir obesidad (Levine y Morley, 1984; Stanley y Leibowitz, 1985; Stanley y cols., 1986; Zarjevski y cols., 1993).

En varios trabajos realizados en cultivos de neuronas simpáticas, se ha visto que el LIF, una citoquina de la familia de la IL-6, producida por la microglía activada y los astrocitos (Banner LR. y cols., 1997), es capaz de reducir la expresión del NPY

(Zigmond y Sun, 1997; MacPhedran y Hall, 2001). Sin embargo, también se ha observado que en ratas con obesidad inducida, que presentaban niveles elevados del ARNm de NPY, AgRP e IL-6 en el Arc y en el PVN, estaban incrementados el MC4R y la IL-6 (Stofkova y cols., 2009). Según esto podríamos pensar que los cambios en el IL-6R $\alpha$  en las neuronas del DA de los animales con sobrepeso podrían ser consecuencia de un aumento de la producción de IL-6 por la microglía. La IL-6 producida por la microglía podría estar mediando la producción de determinados neuropéptidos, como el NPY, cuando se altera el control homeostático con el sobrepeso.

En el VMN y el PVN se produjo una disminución de la intensidad del inmunomarcaje para IL-6R $\alpha$  con el sobrepeso. Estos núcleos hipotalámicos son sensibles a citoquinas inflamatorias. Hallazgos previos indican que la estimulación del sistema inmune activa grupos de neuronas que proyectan al PVN, postulando que el PVN juega un papel importante en la integración de diversas funciones fisiológicas, constituyendo el componente cerebral de la respuesta inmune de fase aguda (Elmquist and Saper, 1996). Por lo tanto, las citoquinas podrían en parte ejercer sus efectos anoréxicos por su acción en las neuronas del PVN.

En el cerebelo, el sobrepeso provocó un incremento en el número de neuronas de Purkinje y de células de glía inmunorreactivas para la IL-6 y el IL-6R $\alpha$ . En las ratas control observamos que las células de Purkinje presentaban una débil inmunorreactividad para la IL-6 y prácticamente ausencia del IL-6R $\alpha$ , y en la sustancia blanca no observamos inmunomarcaje frente a la IL-6 pero sí que encontramos células inmunorreactivas frente al IL-6R $\alpha$ . Este aumento en la inmunorreactividad frente a IL-6 y su receptor coincide con el incremento observado de sus niveles, lo cual parece ser consecuencia del ambiente inflamatorio desarrollado con el sobrepeso. No obstante, aunque hipotálamo y cerebelo se ven afectados por este influjo inflamatorio, cada región responde de forma diferencial, ya que siguen un patrón de inmunorreactividad frente al receptor inverso. Esto podría ser debido a que las citoquinas que entran en el cerebro se concentran más en regiones con mayor permeabilidad de la BBB, como los CVOs (Plotkin y cols., 1996). Por lo tanto, la leptina u otras citoquinas circulantes que inducen la producción de IL-6, pueden concentrarse menos en el cerebelo que en el hipotálamo, por lo que la regulación del IL-6R $\alpha$  sería distinta en las dos regiones.

Lo que sí podemos deducir del presente trabajo es que la regulación del IL-6R $\alpha$  es distinta en el hipotálamo y en el cerebelo, además de caracterizarse por una gran especificidad anatómica y celular, ya que encontramos diferencias no sólo entre los núcleos hipotalámicos, sino entre las células de la glía y las neuronas de Purkinje del cerebelo. Tales diferencias podrían estar relacionadas con las diversas funciones que la IL-6 desempeña en estas células, en el hipotálamo y en el cerebelo.

### **El sobrepeso incrementa la densidad de neuronas MCHérgicas/IL-6R $\alpha$ en la ZI**

La IL-6 y el IL-6R $\alpha$ , podrían estar involucrados en la regulación de distintos neuropéptidos del hipotálamo (Stofkova y cols., 2009). En el presente trabajo nos hemos centrado en la MCH, que es un neuropéptido que estimula el incremento del peso corporal (Qu y cols., 1996; Rossi y cols., 1997). Se sintetiza predominantemente en neuronas localizadas en el LH y la ZI (Skofitsch y cols., 1985; Bittencourt y cols., 1992). En esta última región es donde, en las ratas con sobrepeso, hallamos un aumento de células MCHérgicas que presentaban el IL-6R $\alpha$ . Las neuronas productoras del MCH reciben aferencias de neuronas que integran numerosas señales de la periferia, y que informan al cerebro sobre el estado metabólico e inflamatorio del organismo. Su actividad está modulada por citoquinas y quimioquinas y por ello se las considera uno de los mejores sensores de las alteraciones metabólicas e inflamatorias de la periferia inducidas por la anorexia o la obesidad (Guyon y cols., 2009). Las quimioquinas, como la CXCL-12 y la CCL-2 podrían jugar un papel importante como intermediarios entre las células de glía y las neuronas (Guyon y cols., 2008), reduciendo la actividad eléctrica de las neuronas MCHérgicas y provocando la disminución de la liberación de MCH, contribuyendo así a la anorexia (Guyon y cols., 2009). En pacientes obesos, la CCL-5 contribuye a desencadenar el incremento en la ingesta (Guyon y cols., 2009).

En estudios anteriores, se ha demostrado que las neuronas MCHérgicas de la ZI y del LH expresan el receptor de leptina ObRb, lo cual ha sido relacionado con el papel de la leptina en la liberación de la hormona luteinizante, en la maduración sexual y en la fertilidad (Hakansson y cols., 1998) y con el control inhibitorio de la leptina sobre la función orexigénica de la MCH (Murray y cols., 2000). Según nuestros resultados, la IL-6 como citoquina anorética y su receptor podrían estar participando también en dicho

control, contribuyendo a la modulación de la actividad de las neuronas MCHérgicas y de las funciones neuroendocrinas.

El hallazgo de que las neuronas MCHérgicas, junto con las del DA y las neuronas de Purkinje experimenten variaciones en el IL-6R $\alpha$ , indica que los cambios en los niveles de citoquinas circulantes con el sobrepeso podrían estar afectando a los receptores centrales. El resultado de esta acción dependerá de la función fisiológica de cada región cerebral.

### **La leptina modula al ER $\alpha$ en el hipotálamo y el cerebelo**

Otra cuestión importante a tener en cuenta es la relación entre la leptina y los estrógenos, ya que se sabe que ambas hormonas cooperan en la regulación de la homeostasis energética en el hipotálamo y en el sistema reproductor (Gao y Horvath, 2008). Además, los receptores de estrógenos y leptina están localizados en neuronas de las áreas en las que se sabe que se coordina el metabolismo y la función gonadal, como el Arc, el VMN y el POA (Diano y cols., 1998).

Los estrógenos ejercen un papel importante en la regulación de la reproducción a nivel central, controlando los ciclos hormonales (Hung y cols., 2003). Los estrógenos son necesarios para señalizar la liberación de la hormona GnRH que induce a la secreción pulsátil de la LH (Herbison, 1998). Por otro lado, los estrógenos regulan el apetito y la ingesta afectando a la homeostasis metabólica (Butera y Beikirch, 1989; Bonavera y cols., 1994). Las acciones de los estrógenos son mediadas a través de sus 2 receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (McEwen and Alves, 1999), que se expresan en regiones cerebrales implicadas en el balance energético; por ejemplo ER $\alpha$  es abundante en el Arc (Shughrue y cols., 1997) y ER $\beta$  lo es en el PVN (Orikasa y cols., 2002; Chakraborty y cols., 2003). Se ha observado que ratones *ob/ob* presentaban en el Arc, una inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  mayor que para el ER $\beta$  en comparación con el fenotipo normal (Chakraborty y cols., 2008). Además se ha visto que la leptina es capaz de modular la producción de esteroides *in vivo* en el ovario de la oveja (Kendall y cols., 2004) e *in vitro*, puede inducir la producción de estrógenos mediante transactivación de ER $\alpha$  en la línea de cáncer de mama MCF-7 (Catalano y cols., 2004). Aunque se ha visto

que ambos receptores, el ER $\alpha$  y el ER $\beta$ , afectan a la fertilidad, el ER $\alpha$  es indispensable para la ovulación, lo que sugiere un efecto hipotalámico (DuPont y cols., 2000).

La leptina está involucrada en el desarrollo de la pubertad tanto en humanos como en roedores (Mann y Plant, 2002). Se ha descrito que el tratamiento con leptina restaura la liberación de GnRH y la secreción de la LH y el desarrollo pubertal en pacientes deficientes en leptina, lo que indica su acción en el control de la reproducción a nivel hipotalámico en humanos (Farooqi y cols., 1999). La leptina actúa directamente en el hipotálamo de la rata estimulando la secreción de GnRH *in vivo* (Watanobe, 2002), y su administración a ratas prepuberales acelera el comienzo de la función reproductiva (Chehab y cols., 1997). La obesidad causada por una deficiencia genética de la señalización de la leptina, puede cursar con hipogonadismo hipogonadotrófico, ya que se apagan los ciclos de GnRH y LH (Caprio y cols., 2001). Además, en esta clase de hipogonadismo y en la infertilidad de ambos sexos, se ha observado que existe una deficiencia de la actividad aromatasa en humanos (Simpson, 1998; Bulun, 2000).

En relación con la respuesta inmune, muchos trabajos describen a los estrógenos como potentes antiinflamatorios (Ciesielska, 2003; Czlonkowska y cols., 2007; Vegeto y cols., 2008) e inmunorrepresores de la IL-6 (Ray y cols., 1997). Hay estudios que demuestran que la expresión de ER $\alpha$  es regulada por cambios inflamatorios (Sierra y cols., 2008; Vegeto y cols., 2003). Además, se ha demostrado que las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , juegan un papel importante en la inhibición del eje reproductivo durante cambios inmunes, inhibiendo la secreción de la GnRH y gonadotropina (Gn) (Tomaszewska-Zaremba y Herman, 2009). Por ejemplo, en un estudio realizado con ratas ovariectomizadas, a las que se les inyectó IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  *icv*, se encontraron disminuidos los niveles de LH en plasma (Rivier y Vale, 1990). Basándonos en estos trabajos y teniendo en cuenta que tanto la leptina como el estradiol, están implicados en la función inmune y reproductora, quisimos averiguar si también se estaban modulando los niveles ER $\alpha$  y ER $\beta$  ante el estímulo de la leptina.

La administración de leptina indujo un aumento en los niveles del ER $\alpha$  en el hipotálamo y una disminución en el cerebelo. En ninguna de las dos regiones cerebrales analizadas se vieron alterados los niveles de ER $\beta$ . Estos resultados concuerdan con los trabajos previamente descritos en la literatura, en los que la acción del estradiol en la

función reproductora y metabólica o inmune en el hipotálamo se producía a través del ER $\alpha$ . Según estos resultados podríamos hipotetizar que la leptina podría estar regulando directamente al ER $\alpha$ . Por lo tanto, parece que la leptina *icv* podría estar actuando en distintas funciones fisiológicas, mediando la regulación de forma diferencial del ER $\alpha$  y del IL-6R $\alpha$ , en el hipotálamo y el cerebelo.

En resumen, nuestros hallazgos sobre la presencia de células MHC-II inmunorreactivas en el hipotálamo de las ratas tratadas con leptina *icv*, refuerza el papel proinflamatorio de la leptina, y su acción directa sobre las células de microglía. La leptina parece inducir una respuesta compleja y diferencial en el SNC, en la que sus acciones parecen ser moduladas por el ER $\alpha$  y la IL-6R $\alpha$  y pueden estar involucradas en la homeostasis energética, sistema reproductor o respuesta inflamatoria.

## **2. MODELO DE INFLAMACIÓN *IN VITRO***

### **Efectos del LPS y la leptina en las células BV-2**

Los experimentos realizados *in vitro* nos permitieron analizar de una forma más directa el efecto de la leptina o el estradiol sobre las células de microglía. Estudios previos, han puesto de manifiesto que la leptina es capaz de estimular *in vitro* a las células de microglía induciendo la producción de la IL-1 $\beta$  y el TNF  $\alpha$  (Pinteaux y cols., 2007) y a las células microgliales de la línea BV-2, activando la producción de la IL-6 (Tang y cols, 2007). En nuestros experimentos medimos los niveles de COX-2 como marcador de la actividad inflamatoria de las células BV-2 (Slepko y cols 1997) en respuesta a la leptina y al LPS. El LPS indujo un aumento de los niveles de la COX-2, lo que concuerda con trabajos previos en los que se demostró que el LPS es capaz de inducir un aumento en los niveles de la COX-2 tanto *in vitro*, en las células BV-2 (Slepko y cols 1997) como *in vivo*, en ratas a las que se les inyectó LPS intravenosamente. En este último caso se observó inmunorreactividad frente a la COX-2 en la microglía perivascular y en los macrófagos de las meninges situados al borde del cerebro (Elmqvist y cols., 1997b).

En la inmunidad innata, la leptina es capaz de inducir la producción de la COX-2 y otros factores involucrados en la regulación de la inflamación en diversos tejidos y

tipos celulares (Zarkesh-Esfahani y cols., 2001; Mancuso y cols., 2002; Raso y cols., 2002; Dixit y cols., 2003). También se ha descrito que la administración *icv* de leptina en ratas induce la COX-2 en células endoteliales hipotalámicas (Inoue y cols., 2006). Así pues, la ausencia de un efecto de la leptina sobre la expresión de la COX-2 en las células BV-2 en nuestros experimentos, sugiere que pueden existir mecanismos de regulación diferentes entre la microglía y otros tipos celulares. En nuestros ensayos *in vitro* tampoco detectamos un efecto de la leptina sobre la proliferación celular en la línea BV-2, a pesar de que esta hormona es capaz de inducir un incremento de la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Lord y cols., 1998) y de los monocitos humanos, entre otras células (Santos-Alvarez y cols., 1999).

El LPS, el cual es capaz de inducir la producción de citoquinas como la IL-6 en cultivos primarios de microglía y en la línea tumoral BV-2 (Horvath y cols., 2008), incrementó de una forma más potente que la leptina la expresión de la IL-6 en las células BV-2. Por el contrario, el LPS no tuvo efectos sobre el receptor de IL-6, a diferencia de la leptina que indujo un incremento en el ARNm de la IL-6 y su receptor. Estas diferencias nos llevan a pensar que ambos estímulos son capaces de activar a las células BV-2, pero la respuesta inflamatoria es diferente. Si consideramos que el LPS puede desencadenar una activación en las células más potente que la leptina, como hemos constatado con el aumento de los niveles de COX-2, puede que este estado de inflamación sea concomitante con determinados mecanismos de control intracelulares que se inician para evitar una excesiva respuesta inflamatoria por parte de la microglía, donde uno de los sistemas de control autocrino que primero se iniciaría sería la disminución del número de receptores de citoquinas de la superficie celular (Lee y cols., 2002).

Al estudiar el efecto producido por la combinación de la leptina con el LPS, observamos que la leptina no modificó significativamente los niveles de la COX-2 incrementados por la acción del LPS. No obstante, la combinación de leptina y el LPS tuvo como resultado una bajada de la expresión del gen de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$  a niveles equiparables a los de la situación basal. Esto nos lleva a plantear la hipótesis de que la combinación de ambos factores pueda disparar mecanismos de regulación de la respuesta inmune en cuanto a la producción de determinadas citoquinas, como la IL-6. Estos mecanismos tienen que ver no sólo con la regulación a nivel del receptor, sino con



la activación de SOCS-3 o de otras proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (Hilton y cols., 1998; Nicholson y Hilton y cols., 1998), e incluso con mecanismos de inhibición a nivel de los factores de transcripción involucrados en la señal de transducción de la IL-6, como el factor nuclear para el control de la expresión del gen de la IL-6 (NF-IL-6) (Akira y cols., 1992), lo que conllevaría a un cambio en la respuesta microglial, evitando quizá una respuesta inflamatoria autocrina excesiva para las células BV-2.

Para intentar reforzar la idea de que se está produciendo una regulación de la magnitud de la respuesta inflamatoria generado por la acción del LPS o por su combinación con la leptina, decidimos analizar los niveles de la SOCS-3 en las células BV-2. Las proteínas SOCS son inducibles por numerosos estímulos, entre ellos el LPS y la leptina (Pérez y cols., 2004; Qin y cols., 2007), y su función es inhibir la señalización a través de la ruta de JAK/STAT (Cooney, 2002). Se ha implicado a la SOCS-3 en la resistencia a la leptina en la obesidad por su potente capacidad de inhibición de la señalización del ObR (Bjørbaek y cols., 1999; Howard y cols., 2004; Enriori y cols., 2007). Por otra parte la SOCS-3 es un inhibidor de la vía de señalización JAK/STAT (Cooney, 2002) que se ve activada por la leptina (Bjørbaek y cols., 1998).

Nuestros datos indican que ni la leptina ni el LPS, por separado, en las condiciones de nuestro estudio modifican de una manera significativa los niveles de la SOCS-3 en las células BV-2. Por el contrario, la combinación del LPS y la leptina indujo un aumento significativo de la SOCS-3 en estas células. Por lo tanto, la SOCS-3 podría ser la responsable de la regulación negativa causada por la combinación de la leptina y el LPS sobre los niveles de la IL-6 y de su receptor en las células BV-2.

En el modelo del tratamiento crónico con leptina *icv*, observábamos que la leptina era capaz de incrementar los niveles del ER $\alpha$ , sin alterar los niveles del ER $\beta$ . Sin embargo, en las células BV-2 se producía una modulación del ER $\beta$  por el efecto de la leptina. Estas células no expresan el ER $\alpha$ , pero se sabe que ambos receptores parecen tener un solapamiento en la transcripción de determinados genes diana, aunque otros no sean comunes (Zhao y cols., 2008), por lo cual es posible que el ER $\beta$  pueda estar compensando la ausencia del ER $\alpha$  en las células BV-2.

Se ha observado que la leptina puede actuar como un factor de transactivación del ER $\alpha$  a través de la vía de la MAPK, en la línea celular MCF-7 (Catalano y cols., 2004), es decir que el ER $\alpha$  puede ser transcripcionalmente activado en ausencia del estrógeno en un proceso independiente del ligando (Cenni y cols., 1999). Además Catalano y cols., observaron que la leptina era capaz de estimular la expresión de la enzima aromatasa, a través de MAPK y de la proteína STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción). Además, en las células BV-2 se ha descrito que se puede dar la conversión de la DHEA, por una aromatización de 4-androstenodiona (AD), a estradiol y a otros esteroides C-19, y sin embargo, no se produce la hidroxilación en C7 de la DHEA como en otros tipos celulares (Jellinck y cols., 2005; Jellinck y cols., 2007). Basándonos en estas evidencias, podríamos especular que la leptina quizá esté modulando indirectamente los niveles de ER $\beta$  en las células BV-2, mediante la inducción de la síntesis de estradiol, que podría actuar como un regulador autocrino del ER $\beta$ .

El LPS también es capaz de inducir cambios en los ERs. Según Liu y cols. (2005), el LPS incrementa los niveles del ARNm y de la proteína del ER $\beta$  en cultivos primarios de microglía y los niveles del ARNm del ER $\beta$  en cultivos primarios de astrocitos. En el presente trabajo, hemos observado un claro aumento del nivel del ER $\beta$  ante el estímulo con LPS en las células BV-2. Además en los experimentos realizados *in vivo*, hemos podido comprobar que el LPS es capaz de regular la inmunorreactividad del ER $\alpha$  en la microglía cerebelar de la rata, incrementando el porcentaje de células inmunorreactivas para el ER $\alpha$ .

### **Efectos del LPS y del estradiol en las células BV-2**

Nuestros resultados en el modelo de inflamación *in vivo*, en el que observamos un efecto antiinflamatorio del estradiol y otros compuestos estrogénicos en el cerebelo de animales tratados con LPS, concuerdan con estudios previos en los que se analizaba el papel del estradiol en la respuesta inflamatoria de la microglía *in vitro*. Estos estudios han puesto en evidencia que el estradiol es capaz de prevenir la respuesta inflamatoria inducida por el LPS en cultivos de microglía (Vegeto y cols., 2001) y en las células BV-2 (Baker y cols., 2004). Por el contrario, en el presente trabajo no conseguimos observar un efecto antiinflamatorio del estradiol en las células BV-2. Únicamente la dosis de

estradiol de  $10^{-10}$  M consiguió reducir parcialmente la respuesta inflamatoria inducida por el LPS, pero los niveles de COX-2 seguían siendo muy elevados con respecto al estado basal de las células. La diferencia con el trabajo realizado por Baker y cols., en 2004, podría radicar en el procedimiento experimental, ya que el autor de este trabajo realiza un pretratamiento con estradiol, planteando dos protocolos distintos de estimulación, 1) añadiendo el estradiol 1 hora y retirándolo antes de tratar las células con el LPS durante 16 horas y 2) incorporando el estradiol durante 1 hora previo a la estimulación con el LPS y manteniendo ambos tratamientos durante 16 horas. En nuestro protocolo experimental, el tiempo de estimulación de las células con el tratamiento hormonal y el LPS, fue de 24 horas y además no realizamos ningún tratamiento previo con estradiol ya que estimulamos a las BV-2 con el estradiol y el LPS simultáneamente. Por lo tanto, es posible que el estradiol pueda prevenir la inflamación, pero no sea capaz de revertirla.

Respecto al papel del estradiol sobre la proliferación celular, numerosos trabajos en la literatura estudian esta acción hormonal en distintos tipos celulares. Una de las teorías que hace referencia a los mecanismos de formación de tumores es que los estrógenos causan proliferación celular (Russo y Russo, 1998; Yager y Davidson, 2006). Además, el estradiol *in vivo*, es capaz de regular la proliferación y supervivencia de nuevas neuronas en la capa granular del giro dentado del hipocampo (Ormerod y Galea, 2001; Fester y cols., 2006). Por el contrario, el estradiol regula a la baja la proliferación astrogliar y la activación de los astrocitos en una lesión cerebral penetrante (Barreto y cols., 2007; Garcia-Estrada y cols., 1993, 1999) y en un proceso de neurodegeneración inducido por excitotoxicidad (Ciriza y cols., 2004). También se ha descrito que el estradiol puede regular la proliferación y maduración de los progenitores de oligodendrocitos, *in vitro* (Okada y cols., 2008) e inhibir la proliferación celular en cultivos de microglía (Ganter y cols., 1992). Sin embargo, en los experimentos realizados con las células BV-2, no detectamos ningún efecto del estradiol sobre la proliferación celular, observando de nuevo un efecto diferencial en la línea BV-2 en comparación a otros tipos celulares.

A pesar de no encontrar un efecto significativo en la reducción de COX-2, ni hallar cambios en la proliferación celular, encontramos que en las células BV-2 se produjo un incremento de la expresión del gen de la IL-6 y de IL-6R $\alpha$  por la acción del

estradiol comparado con la situación basal, aunque de menor magnitud que la provocada por el LPS. Por el contrario, el estradiol en combinación con el LPS reguló a la baja la expresión del gen de IL-6 y los niveles de su receptor. Estos resultados sugieren que en determinados tipos celulares y en determinadas circunstancias el estradiol puede tener de por sí un moderado efecto proinflamatorio, aunque ejerza un efecto contrario en condiciones de inflamación. Estos resultados distan totalmente de la acción del estradiol en otra línea de microglía de ratón, la N9, donde el estradiol no induce a la IL-6 y en combinación con el LPS tampoco es capaz de modular a la citoquina (Suuronen y cols., 2005). La inducción de la IL-6 por parte del estradiol en las células BV-2 en condiciones basales podría formar parte de un mecanismo de acción no vinculado a una respuesta inflamatoria y que estaría más bien relacionado con la participación de la hormona en el control del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular (Gadient y Otten, 1997). Por ejemplo, Bengtsson y cols., en 2004, observaron que el estradiol era capaz de incrementar la producción de IL-6 y otras quimoquinas en cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos humanos, potenciando de esta manera la capacidad de migración de estas células. También se ha detectado que la progesterona induce la diferenciación de las células “natural killer” uterinas a través de un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el TNF- $\alpha$  (Hunt y cols., 1977). En células epiteliales endometriales primarias inmortalizadas de origen humano, se ha descubierto que las citoquinas IL-6, LIF e IL-11 y sus receptores son relevantes para la implantación embrionaria, y que el estradiol produce una regulación al alza de la IL-6, y junto con la progesterona, también del IL-6 $\alpha$  (Hombach-Klonisch y cols., 2005). El estradiol también parece aumentar la proliferación en las líneas celulares humanas OVCAR-3 y CAO-3 de cáncer de ovario en parte por la inducción de expresión de la IL-6 y la IL-8 y de sus receptores, IL-6R $\alpha$ , gp130 e IL-8R (Yang y cols., 2009). Aunque nosotros no detectamos variaciones en la proliferación celular, sí que observamos un ligero cambio en el fenotipo de las células que fueron incubadas con el estradiol, encontrando una densidad mayor de células que presentaban prolongaciones citoplasmáticas (resultados no mostrados). En este sentido cabe mencionar que la IL-6 influye en la elongación y ramificación dendrítica de las neuronas hipocámpales (Kim y Diamond, 2002; Sarder y cols., 1996).

El efecto antiinflamatorio del estradiol en presencia de LPS en las células BV-2 concuerda con los efectos antiinflamatorios de la hormona detectados en otras células, como en astrocitos estimulados con LPS (Cerciat y cols., 2010), en una línea de osteoblastos (U2-OS) y en células estromales de médula ósea activas por IL-1 $\beta$  (Stein y Yang, 1995) y en una línea celular de endocarcinoma endometrial *Ishikawa* bajo la acción de un éster de forbol (Ray y cols., 1997). Finalmente, es posible que el efecto del estradiol en las células BV-2 difiera respecto de su efecto en otros tipos celulares por el hecho ya mencionado de que las células BV-2 no expresan el ER $\alpha$ . En este sentido es interesante que tanto en presencia como en ausencia de LPS el estradiol incrementa los niveles de expresión del ER $\beta$  en las células BV-2. Es posible que el ER $\beta$ , en un ambiente no inflamatorio pueda aumentar la expresión de IL-6, mientras que en el ambiente proinflamatorio causado por el LPS, pueda reprimir dicha expresión.

### **3. MODELO DE INFLAMACIÓN *IN VIVO***

#### **Efecto del LPS sobre el peso corporal y los niveles de leptina**

La administración sistémica del LPS, produce inflamación periférica, lo cual induce anorexia y provoca una disminución del peso corporal (Sachot y cols., 2004; Gautron y cols., 2005) mediante cambios en el comportamiento alimenticio y una disminución del número de comidas (Porter y cols., 1998).

La ovariectomía produce un aumento del peso corporal, una disminución en los niveles del ARNm de leptina en el tejido adiposo y una disminución de los niveles de leptina en plasma. Estos efectos de la ovariectomía se revierten con la administración de estradiol (Brann y cols., 1999; Machinal y cols., 1999; Shimizu y cols., 1997; Chu y cols., 1999; Alonso y cols., 2007). Esto puede ser debido a que el estradiol podría estar regulando los niveles de leptina en plasma por una acción directa sobre el gen de la leptina en el adipocito (Machinal y cols., 1999). Por otra parte, el estradiol podría incrementar los ObRb en el hipotálamo y en el tejido adiposo (Rocha y cols., 2004; Alonso y cols., 2007). Nuestros hallazgos han puesto en evidencia la pérdida de peso en las hembras tratadas con LPS después de una semana de ovariectomía. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que el LPS sistémico induce desensibilización a las respuestas del eje HPA e hipofagia (Grinevich y cols., 2001; Borges y cols., 2007). La anorexia inducida por el LPS es mediada por la síntesis de

citoquinas, especialmente por la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF $\alpha$  sintetizados por monocitos y macrófagos (Johnson, 1998; Wisse, 2006; Von Meyenbrg y cols., 2003). Así, inyecciones periféricas y centrales de la IL-1 $\beta$  o del TNF- $\alpha$  suprimen el consumo de comida (Mahony y Tisdale, 1998; Plata-Salamán y cols., 1996). Por otra parte, la IL-6 media en la anorexia inducida por el LPS (Kozak y cols., 1997; Guijarro y cols., 2006). Además la administración de la IL-6 por vía *icv* estimula el gasto energético (Rothwell y cols., 1991; Wallenius y cols., 2002a) y disminuye el peso del pániculo adiposo retroperitoneal y mesentérico y los niveles de leptina circulante (Wallenius y cols., 2002b). También en ratones portadores de tumores que secretan la IL-6 se ha observado una reducción de la grasa corporal (Metzger y cols., 2001). En el presente estudio observamos que las ratas que experimentaron pérdida de peso corporal presentaban unos niveles de leptina sistémicos bajos. Hay estudios que demuestran lo contrario, que el LPS realza los niveles de leptina en plasma (Sarraf y cols., 1997; Mastronardi y cols., 2005) sugiriendo un papel participativo de la leptina en la anorexia inducida por una endotoxina. Además, Sachot y cols., 2004, encontraron que animales pretratados con un anticuerpo bloqueante de leptina no mostraban anorexia ni pérdida de peso tras la administración de LPS. Sin embargo, hay estudios en los que no se observa un incremento de leptina (Gautron y cols., 2005) o se observa una disminución dependiendo de si se inyecta LPS en una única dosis o se realiza un tratamiento crónico. Por ejemplo, en un estudio realizado por Borges y cols., 2007, una sola dosis de LPS redujo la ingesta y la ganancia de peso, pero no indujo cambios en los niveles de leptina. Sin embargo, varias dosis de LPS provocaron un descenso de la leptinemia acompañado de una ganancia de peso y una mayor ingesta, en comparación con una única dosis de LPS. Los autores relacionaron el descenso de los niveles de leptina en plasma con su contribución a la desensibilización del efecto anorexigénico resultante del tratamiento repetido con la endotoxina. En nuestro modelo experimental, en el que administramos dos inyecciones de LPS en una semana, observamos un descenso en la leptinemia. Esto puede deberse al control ejercido por los mediadores inflamatorios, además de los hormonales, sobre los niveles de leptina (Lam y Lu, 2007). De hecho, aunque las citoquinas pueden estimular la liberación de leptina a la circulación, una larga exposición a citoquinas durante una inflamación crónica, puede reducir las concentraciones de leptina en plasma (Popa y cols., 2005). Por ejemplo, Unno y cols., 2006 han demostrado que el óxido nítrico media la regulación a la baja de la leptina y el interferón- $\gamma$  en adipocitos, después de una exposición prolongada al LPS.

### **Modulación de la IL-6 y el IL-6R $\alpha$ en el cerebelo**

La deficiencia de estrógenos, como consecuencia de la ovariectomía, de la menopausia o de otras causas, eleva los niveles de citoquinas proinflamatorias en la sangre, la médula ósea y los monocitos (Manolagas y Jilka, 1995; Pacifici, 1996,1998; Cheleuitte y cols., 1998; Rodan y Martin, 2000; Zeitlin y cols., 2003). En particular, se ha considerado a los estrógenos potentes represores de la IL-6 (Ray y cols., 1997). De hecho, la ovariectomía, aumenta la producción de la IL-6 en los osteoblastos y células estromales de la médula ósea (Jilka y cols., 1992; Girasole y cols., 1992; Passeri y cols., 1993). Por lo tanto, la interrupción del control homeostático de la IL-6 en mujeres postmenopáusicas podría precipitar la osteoporosis, tal y como sugieren experimentos realizados en modelos animales (Jilka y cols., 1992).

Para esclarecer el estado inflamatorio en las ratas tratadas con LPS después de 1 semana de ovariectomía y en las ratas tratadas con los compuestos estrogénicos o una combinación de ambos factores, analizamos la inmunoeexpresión de la IL-6 y del IL6-R $\alpha$  en el cerebelo, dado que es un área cerebral especialmente sensible al LPS (Vorbodt y cols., 2005) y tiene una elevada población de microglía residente (Savchenko y cols., 2000), además de desempeñar un papel relevante en la integración somática-visceral del control de la ingesta y motivación por el alimento, como hemos mencionado anteriormente (Zhu y cols., 2008).

Estudios realizados en roedores, demuestran que la IL-6 y el IL-6R $\alpha$  se expresan en el cerebelo. La mayoría de los tipos celulares cerebelares, incluyendo las neuronas de Purkinje, granulares, interneuronas inhibitorias, células de la glía de Bergmann y células gliales, excepto los oligodendrocitos, expresan el ARNm de IL-6R $\alpha$  y gp130 o la proteína (Sawada y cols., 1993; Schöbitz y cols., 1993; Nelson y cols., 1999; Ha y King., 2000). La expresión de la IL-6 y el IL-6R $\alpha$  en condiciones basales por las células cerebelares sugiere que esta citoquina juega un papel en la regulación de la función cerebelar por una acción paracrina o autocrina (Gadient y cols., 1994).

En nuestro modelo de inflamación *in vivo* encontramos células inmunorreactivas frente a la IL-6 en la sustancia blanca, en las capas molecular y granular y en las neuronas de Purkinje. Observamos que las ratas control ovariectomizadas presentaban

en general, mayor densidad de células inmunorreactivas frente a la IL-6 y el IL-6R $\alpha$  que las ratas tratadas posteriormente con los SERMs. Curiosamente, el raloxifeno fue capaz de reducir las células inmunorreactivas frente a la IL-6 tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris, y sin embargo tuvo un efecto diferencial en cuanto a la immunoexpresión del IL6-R $\alpha$ , ya que fue capaz de reducir el número de neuronas de Purkinje inmunorreactivas para el IL6-R $\alpha$ , no siendo así en la sustancia blanca. Parece que el raloxifeno induce una modulación de la respuesta inflamatoria diferente en las células de la sustancia blanca. Además cuando analizamos las células inmunorreactivas para MHC-II en este mismo tejido observamos que el raloxifeno tenía por sí mismo un moderado efecto proinflamatorio en la sustancia blanca, a diferencia de las ratas tratadas con estradiol o tamoxifeno. En las ratas control de una semana de ovariectomía, pese a la alta densidad de células inmunorreactivas para IL-6 y el IL-6R $\alpha$ , no encontramos astrogliá reactiva, y apenas algunas células inmunorreactivas frente a MHC-II, por lo que los altos niveles de la IL-6 como consecuencia de la ovariectomía, parece que no ejercen un efecto inflamatorio en las células de la glía.

En las ratas tratadas con LPS las células IL-6 inmunorreactivas en la sustancia blanca y en la capa de células de Purkinje fueron abundantes, y también detectamos una gran densidad de células de microglía inmunorreactivas. El LPS produjo un efecto diferencial sobre el IL-6R $\alpha$  en la sustancia blanca y la sustancia gris. Al igual que en las ratas control, las neuronas de Purkinje inmunorreactivas para el IL-6R $\alpha$  seguían siendo igualmente abundantes. Por el contrario, las células de la sustancia blanca se comportaron de distinta forma, ya que apenas encontramos células inmunorreactivas frente al IL-6R $\alpha$ .

Esta modulación diferencial del IL-6R $\alpha$ , podría estar relacionada con el aclaramiento de la IL-6 y las diferentes funciones que desempeñan las neuronas de Purkinje y las células de la glía.

El papel de la IL-6 en el cerebelo se ha analizado mediante el uso de ratones transgénicos. Así, los ratones transgénicos para la IL-6 muestran signos de disfunción cerebelar tales como la ataxia, debido en parte a alteraciones de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de Purkinje y también a cambios en la señalización y la homeostasis intracelular del Ca<sup>2+</sup> (Gruol y Nelson, 2005; Quintana y cols., 2009).



Las células de glía están más involucradas en la modulación de la respuesta inmune local (Fattori y cols., 1995) si las condiciones llegan a inducir un ambiente muy inflamatorio, como quizá esté ocurriendo en las ratas tratadas con LPS, las células de la glía podrían estar ejerciendo un control que regulara a nivel del receptor una respuesta inflamatoria exacerbada. Además, como anteriormente hemos detallado, el complejo IL-6/ IL-6R $\alpha$  se internaliza después de la unión a la membrana y la activación de gp130. Es posible que el aclaramiento de la IL-6 y los niveles de la IL-6 *in vivo*, sean determinados por un equilibrio entre la retención y la internalización del complejo IL-6/ IL-6R $\alpha$ .

En este estudio no observamos un efecto diferente sobre la inmunorreactividad de las células de Purkinje frente a la IL-6 cuando combinamos el estradiol, tamoxifeno o raloxifeno con el LPS, sin embargo se apreciaron menos células inmunorreactivas para la IL-6 y una menor densidad de microglía reactiva, en la sustancia blanca.

En cuanto al IL-6R $\alpha$ , los 3 compuestos estrogénicos fueron capaces de reducir significativamente el número de células de Purkinje inmunorreactivas. En la sustancia blanca encontramos un leve marcaje de células inmunorreactivas frente a IL-6R $\alpha$  comparado con la situación basal. En el caso de las ratas tratadas con raloxifeno y LPS, encontramos menos células que cuando administramos el raloxifeno sólo. Además al analizar el número de células MHC-II inmunorreactivas observamos que el raloxifeno consiguió revertir el efecto proinflamatorio del LPS, encontrando menos células inmunorreactivas para MHC-II que en las ratas tratadas con sólo raloxifeno. De nuevo, observamos que la regulación del receptor en las células de Purkinje y las células de glía de la sustancia blanca es diferente, y que en las células de glía parece que los compuestos estrogénicos junto con el LPS pueden tener un efecto diferente a cuando son administrados solos, como es el caso del raloxifeno. Probablemente, se esté produciendo un control de la respuesta inflamatoria más potente debido a la acción antiinflamatoria de los compuestos estrogénicos.

En resumen, la ovariectomía y la acción proinflamatoria del LPS modulan la densidad de células inmunorreactivas para IL-6 y el IL-6R $\alpha$ , tanto en las células de glía de la sustancia blanca como en las neuronas de Purkinje, que estarían desempeñando funciones diferentes, y por lo tanto sufren regulaciones distintas ante el LPS. Con la

adición de estradiol, tamoxifeno o raloxifeno parece que se establece un control de la IL-6 y su receptor, produciéndose una disminución del inmunomarcaje frente a IL-6 y el IL-6R $\alpha$  en las neuronas de Purkinje.

Los SERMs actúan de forma distinta en la sustancia blanca, ya que el raloxifeno incrementa claramente la densidad de células inmunorreactivas para el IL-6R $\alpha$ .

### **La modulación de la activación microglial en el cerebelo**

La inflamación en el sistema nervioso central es regulada por células de la glía residentes y células inmunes infiltradas (Ladeby y cols., 2005; Pekny y Nilsson, 2005).

La administración sistémica de LPS se describió previamente, como un método eficaz para inducir la activación de la microglía en el cerebro de la rata (Buttini y cols., 1996; Ng y Ling, 1997; Semmler y cols. 2005; Qin y cols., 2007; Sierra y cols., 2007).

De acuerdo con esto, detectamos un acusado incremento en el número de células inmunorreactivas frente a MHC-II en el cerebro tras la administración sistémica de LPS. Las células MHC-II inmunorreactivas fueron particularmente abundantes en los tractos de sustancia blanca y por lo tanto seleccionamos la sustancia central del cerebelo como objeto de estudio. La morfología de las células inmunorreactivas para MHC-II, con somas agrandados y con procesos finos y retraídos, correspondía con el típico fenotipo de microglía activada (Ladeby y cols., 2005). En algunas secciones de cada grupo experimental, empleamos un marcador de inflamación adicional, el anticuerpo frente al enzima lisosomal de rata (anti-CD68; ED1), un marcador fagocítico fidedigno que detecta microglía fagocítica (Graeber y cols., 1990; Bauer y cols., 1994). Se obtuvieron resultados cualitativos similares con ambos anticuerpos, MHC-II y ED-1.

En el presente trabajo hemos encontrado que el estradiol disminuye la activación microglial después de la administración sistémica de LPS. El efecto del estradiol se observó en ratas hembra ovariectomizadas y en ratas macho intactos, indicando que la hormona podría participar también en los efectos antiinflamatorios en el cerebro de las ratas macho. Estudios previos han mostrado que la activación de la microglía y la expresión génica se ven afectadas por el estradiol ovárico. Ensayos realizados en cultivos de microglía han demostrado que el estradiol inhibe la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y de otros mediadores inflamatorios en respuesta a LPS y a

citoquinas proinflamatorias (Bruce-Keller y cols., 2000, 2001; Drew y Chavis, 2000; Vegeto y cols., 2001; Baker y cols., 2004; Dimayuga y cols., 2005). Estudios *in vivo* han demostrado que el estradiol reduce la reactividad microglial y la expresión de citoquinas y quimoquinas inducidas por una inyección aguda intracerebroventricular en ratones hembra (Vegeto y cols., 2001, 2003, 2006). El estradiol es también efectivo en la reducción del estado de activación microglial crónico alrededor de las placas  $\beta$ -amiloides en el cerebro de ratones hembra APP23, un modelo de enfermedad de Alzheimer (Vegeto y cols., 2006) y reduce la activación de la microglía después de una lesión penetrante en el hipocampo (Barreto y cols., 2007).

Nuestros hallazgos indican también que los SERMs empleados actualmente con un objetivo terapéutico en humanos, como el tamoxifeno y el raloxifeno, en un rango de dosis empleado en la práctica clínica (Bernstein y cols., 1999; Palacios y cols., 2004; Stovall y cols., 2007), son capaces de reducir la activación microglial en el sistema nervioso central tras la administración de LPS en machos y hembras. Estudios previos han demostrado que el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyen la respuesta inflamatoria de las células de microglía inducida por el LPS, *in vitro* (Suuronen y cols., 2005) y que el raloxifeno disminuye el número de células de microglía en el cerebro de animales viejos (Lei y cols., 2003). También se ha demostrado que el tamoxifeno es capaz de reducir el daño cerebral en ratas tras una isquemia, *in vivo* (Kimelberg y cols., 2003; Mehta y cols., 2003; Feng y cols., 2004; Zhang y cols., 2005) y que tanto el tamoxifeno como el raloxifeno previenen la pérdida neuronal inducida por excitotoxicidad en el hipocampo de ratas inyectadas con ácido kaínico (Ciriza y cols., 2004). Además, estos SERMs ejercen efectos neuroprotectores en diferentes modelos *in vitro* (Du y cols., 2004; Benvenuti y cols., 2005; Biewenga y cols., 2005). Aunque los estudios *in vitro* indican que el tamoxifeno y el raloxifeno pueden tener efectos neuroprotectores directos en las neuronas (Du y cols., 2004; Benvenuti y cols., 2005; Biewenga y cols., 2005), nuestros resultados sugieren que ambos SERMs también podrían ejercer en parte, sus efectos neuroprotectores *in vivo*, mediante la regulación de la activación microglial.

Aunque la respuesta de la microglía al estradiol y los SERMs fue, en general, similar entre hembras tratados 1 semana y 1 mes tras la ovariectomía y machos, detectamos algunas diferencias interesantes. Por ejemplo, las dosis de estradiol efectivas para la disminución de la reactividad microglial no fueron las mismas en machos que en

hembras. Además, por si mismo, el raloxifeno tuvo una moderada acción proinflamatoria en hembras pero no en machos. Estas diferencias sugieren que el diferente estado endocrino entre machos y hembras puede afectar a la respuesta inflamatoria. Las diferencias podrían también reflejar un dimorfismo sexual en la respuesta de la microglía a ligandos estrogénicos. Además, en las ratas tratadas 1 semana tras la ovariectomía, el efecto antiinflamatorio del tamoxifeno fue detectado con todas las dosis ensayadas, mientras que el raloxifeno perdió sus efectos antiinflamatorios a la dosis más alta (2 mg/Kg). Similarmente, un estudio previo realizado *in vivo*, en el que se examina el efecto neuroprotector de estos dos SERMs, a dosis similares, mostró que el tamoxifeno tuvo un efecto neuroprotector en todas las dosis ensayadas, mientras que el raloxifeno perdió su potencia neuroprotectora a la dosis de 2 mg/kg (Ciriza y cols., 2004). Además, el tamoxifeno parece tener un perfil antiinflamatorio mejor que el raloxifeno en el cerebro. Por otra parte, la acción proinflamatoria moderada del raloxifeno en el cerebro de las ratas hembra que no fueron tratadas con el LPS sugiere que algunos compuestos estrogénicos pueden tener un impacto negativo en el cerebro sano, aunque sean capaces de disminuir la inflamación cerebral bajo condiciones patológicas. Esta posibilidad, merece ser explorada en detalle, y podría ser altamente relevante para la terapia humana y para la interpretación de la consecuencia neurológica de ensayos clínicos aleatorios en los que los compuestos estrogénicos son administrados a mujeres con postmenopausia asintomática.

Nuestros resultados son complementarios a los de estudios previos *in vivo*, en los que se ha demostrado que el estradiol reduce la activación de la microglía después de una inflamación local cerebral (Vegeto y cols., 2001, 2003, 2006). En nuestro estudio, la activación de la microglía fue probablemente secundaria a la inflamación periférica ya que hay un paso reducido de LPS periférico a través de la BBB (Nadeau y Rivest, 1999). Las citoquinas proinflamatorias sistémicas, tales como el TNF- $\alpha$ , son críticas para la transferencia de la inflamación periférica inducida por el LPS al sistema nervioso central (Qin y cols., 2007). Estas citoquinas proinflamatorias atraviesan la BBB y activan a las células de microglía y a la astrogía para producir más mediadores inflamatorios (Laye y cols., 1994, Pitossi y cols., 1997, Eriksson y cols., 2000, Combrinck y cols., 2002, Choi y cols., 2003, Zuurman y cols., 2003, Sierra y cols., 2007), lo que finalmente causará una inflamación crónica en el sistema nervioso central y una neurodegeneración progresiva (Perry y cols., 2003, Cunningham y cols., 2005,

Semmler y cols., 2005, Qin y cols., 2007). Por otra parte, los compuestos estrogénicos también pueden atravesar la BBB y actuar directamente en el cerebelo para reducir el efecto inflamatorio de las citoquinas periféricas ya que el estradiol es capaz de reducir la activación inflamatoria en cultivos primarios de microglía y en líneas celulares de microglía que expresan ERs (Bruce-Keller y cols. 2000, 2001, Drew y Chavis, 2000, Vegeto y cols., 2001, Baker y cols., 2004, Dimayuga y cols., 2005).

En diversos estudios se ha detectado la expresión del ER $\beta$  en la microglía del hipocampo de monos después de una isquemia cerebral (Takahashi y cols., 2004) y la expresión del ER $\alpha$  en microglía aislada del cerebro de ratones adultos (Sierra y cols., 2008). Nuestros resultados sugieren que las células de microglía en el cerebelo de la rata, *in vivo*, expresan el ER $\alpha$  pero aparentemente no expresan el ER $\beta$ , aunque no se puede excluir que el ER $\beta$  se exprese en la microglía cerebelar a niveles demasiado bajos para ser detectados por las técnicas de inmunohistoquímica. La localización puntiforme de la inmunorreactividad frente a ER $\alpha$  en los procesos celulares y en el pericarion de las células microgliales concuerda con estudios previos de inmunodetección por microscopía electrónica del ER $\alpha$  en el hipocampo de ratón (Sierra y cols., 2008) y es comparable con los mecanismos de acción no clásicos del ER a través de acciones en la membrana y el citoplasma (Beyer y cols., 2003, Kelly y cols., 2005, Marin y cols., 2005, Suuronen y cols., 2005). Con respecto a esto, resulta interesante que en los macrófagos, el estradiol ejerza un efecto antiinflamatorio por un mecanismo de activación no clásico, que involucra a la activación de la PI3K, que a su vez es mediado por el ER $\alpha$ , y no por el ER $\beta$  (Ghisletti y cols., 2005).

Además, acciones centrales antiinflamatorias del estradiol tras una inyección intracerebral de LPS se pierden en los ratones ER $\alpha$ KO (Vegeto y cols., 2003), sugiriendo que el ER $\alpha$  que se expresa en cerebro está involucrado en el efecto estrogénico. Sierra y cols. (2008) han detectado recientemente una disminución en los niveles del ARNm de ER $\alpha$  en la microglía aislada del cerebro de ratones tratados con LPS, indicando que la expresión del ER $\alpha$  en la microglía es regulada por cambios inflamatorios. De acuerdo con esto, nosotros hemos encontrado que el LPS regula la inmunorreactividad de ER $\alpha$  en la microglía cerebelar de la rata. Sin embargo, en nuestro estudio, hemos detectado un incremento en el porcentaje de células inmunorreactivas para ER $\alpha$ , mientras que Sierra y cols. (2008) detectaron una disminución de los niveles

de ARNm en la microglía. Entre alguna de las posibles causas que pudieran explicar la aparente discrepancia, estaría la diferencia en el curso temporal del análisis después de la exposición al LPS, tratándose de horas en el caso del estudio de Sierra y cols., (2008) y de días en nuestro estudio. Debemos de tener en cuenta también, que aunque el número de células que están inmunoexpresando el ER $\alpha$  está incrementado, el nivel por célula puede ser menor o incluso no variar.

Nuestros resultados también sugieren que la duración de la privación hormonal puede afectar a la acción del LPS sobre la inmunorreactividad frente al ER $\alpha$  y que algunos compuestos estrogénicos, tales como el 17 $\beta$ -estradiol y el tamoxifeno son capaces de regular el marcaje para el ER $\alpha$  en el pericarion de las células microgliales. Este efecto podría estar mediado por cambios en la expresión y/o en la localización intracelular del ER $\alpha$  en la microglía. Además, el 17 $\beta$ -estradiol contrarresta el efecto del LPS en la distribución de la inmunorreactividad frente a ER $\alpha$  en la microglía. Estos resultados sugieren que el ER $\alpha$  está involucrado en la respuesta de la microglía al LPS y a los compuestos estrogénicos. Por lo tanto, al menos una parte de los efectos antiinflamatorios de los compuestos estrogénicos en el cerebro podría ejercerse por un efecto directo sobre las células microgliales que expresan el ER $\alpha$ . Por otra parte, los compuestos estrogénicos podrían actuar sobre los ERs expresados en otras células cerebelares tales como las neuronas de Purkinje, que como se ha demostrado, en nuestro estudio y en trabajos previos, expresan el ER $\beta$  (Shughrue y cols., 1997, Price y Handa, 2000). Los axones de las neuronas de Purkinje atraviesan la sustancia blanca central del cerebelo, y es perfectamente concebible su interacción funcional con la microglía en esta localización. También los axones aferentes que llegan al cerebelo de neuronas que expresan ERs podrían transmitir indirectamente señales estrogénicas a la microglía.

Realizamos experimentos con los agonistas del ER $\alpha$  (PPT) y el ER $\beta$  (DPN) para intentar esclarecer si realmente el efecto del estradiol y los compuestos estrogénicos, podría estar mediado sólo por el ER $\alpha$  o por el contrario el ER $\beta$  estaría también participando en la acción antiinflamatoria. Nuestros resultados indican que estos dos agonistas son capaces de reducir la activación microglial en el sistema nervioso central tras la administración de LPS en las hembras tratadas con LPS 1 semana después de la ovariectomía, sin embargo el efecto parece estar mediado predominantemente por el ER $\alpha$ , ya que el DPN es capaz de contrarrestar los efectos del LPS únicamente a una

dosis muy elevada. Una posible explicación sea que quizá, se esté perdiendo la especificidad del receptor ante una concentración elevada del DPN, ya que aunque el PPT tenga mayor afinidad por el ER $\alpha$  (Stauffer y cols., 2000) y el DPN mayor afinidad por el ER $\beta$  (Meyers y cols., 2001), ambos compuestos son agonistas para los dos subtipos del ER. Por otro lado, al combinar ambos compuestos no observamos ningún efecto sinérgico en la disminución de las células MHC-II inmunorreactivas, por lo que creemos de nuevo, que la acción antiinflamatoria está mediada predominantemente por el ER $\alpha$ .

Finalmente, nuestros hallazgos en las hembras muestran una pérdida de la capacidad de la acción antiinflamatoria del raloxifeno, a la dosis de 1 mg/kg, 1 mes después de la ovariectomía, en comparación con su actividad antiinflamatoria 1 semana después de la ovariectomía, indicando que la duración previa de la privación hormonal ovárica podría afectar a los efectos antiinflamatorios de algunos SERMs. La causa de estas diferencias podría ser debida a cambios en la expresión de los ERs o de cofactores para la transcripción mediada por los ERs en las células neurales. De hecho, nuestros resultados indican que la expresión basal del ER $\alpha$  en la microglía disminuye un mes después de la ovariectomía en comparación con una semana de ovariectomía. Por otro lado, el raloxifeno no afectó a la localización del ER $\alpha$  en la microglía de las ratas tratadas con LPS una semana después de la ovariectomía, pero disminuyó la localización de ER $\alpha$  en la microglía de los animales tratados con LPS un mes después de la ovariectomía. La modificación en la respuesta del raloxifeno debido a la duración prervia de la privación de hormonas ováricas podría tener relevancia para el uso terapéutico de este SERM. Curiosamente, un estudio reciente ha puesto en evidencia que el tratamiento con estrógeno administrado inmediatamente a la vez que la ovariectomía en roedores atenúa la producción central y periférica de citoquinas proinflamatorias tras un ictus isquémico. Por el contrario, el estradiol no suprimió la producción de moléculas proinflamatorias cuando fue administrado 10 semanas después de la ovariectomía (Suzuki y cols., 2007). Además, las acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras del estradiol y los compuestos estrogénicos podrían verse afectadas por la duración de la privación de las hormonas ováricas y esto podría al menos parcialmente explicar las diferencias observadas en el resultado de la terapia hormonal entre mujeres peri y postmenopáusicas (Maki, 2005; Miller y cols., 2005).

En resumen, nuestros resultados indican que el 17 $\beta$ -estradiol y los SERMS; tamoxifeno y raloxifeno reducen la activación microglial en machos y en hembras, tras la inflamación periférica inducida por la administración de LPS, por un mecanismo que podría involucrar a los ERs en la microglía. Mientras el tamoxifeno redujo la activación microglial en todas las dosis ensayadas, el raloxifeno perdió su efecto antiinflamatorio a dosis altas y tuvo por sí mismo un moderado efecto proinflamatorio en el cerebro de las ratas hembra, junto con un aumento de las células inmunorreactivas frente a la IL-6 en la sustancia blanca. Además, en las hembras, la duración previa de la privación ovárica hormonal afecta a la acción antiinflamatoria del raloxifeno. Estos hallazgos indican que la modulación de la actividad de los ERs empleando SERMs representa un abordaje terapéutico potencial para reducir la activación microglial y el daño en el sistema nervioso central después de una inflamación sistémica, y sugiere que la duración previa de la privación hormonal ovárica podría afectar a la actividad de algunos compuestos estrogénicos en la microglía.



## **CONCLUSIONES**

1. El sobrepeso induce cambios en la respuesta inflamatoria a nivel central, activando a las células microgliales en zonas desprovistas de BBB como la EM, y en diversas áreas cerebrales involucradas en el control de la ingesta como el VMN y el cerebelo, por lo que la microglía podría desempeñar un papel en la respuesta central a cambios metabólicos.
2. La leptina puede estar involucrada, al menos en parte, en la activación microglial inducida por el sobrepeso, ya que ejerce un efecto sobre la activación de las células del sistema inmune innato en el cerebro.
3. La leptina modula la expresión de la IL-6 y del IL-6R $\alpha$  en la microglía. Esta respuesta es diferencial dependiendo del estado inicial de la activación microglial. Estos resultados sugieren que la activación de la microglía podría estar involucrada en el incremento de los niveles de la IL-6 y el IL-6R $\alpha$  a nivel central en las ratas con sobrepeso.
4. El estado de sobrepeso está asociado a un cambio en la distribución de la inmunorreactividad para el IL-6R $\alpha$  en las áreas hipotálamicas involucradas en el control metabólico, incluyendo cambios específicos en la distribución de neuronas IL-6R $\alpha$  positivas que expresan el MCH. Esto sugiere que la respuesta a la IL-6 en estas áreas está modificada, lo cual podría estar involucrado en los cambios metabólicos observados en los sujetos con sobrepeso.
5. La leptina y el estradiol estimulan la expresión de la IL-6, el IL-6R $\alpha$  y el ER $\beta$  en la microglía *in vitro*, indicando que estas dos hormonas pueden tener efectos similares en las células inmunes, además de poseer acciones entrelazadas ya que la leptina puede modular la respuesta microglial al estradiol, mediante la regulación de la expresión de su receptor *in vivo* e *in vitro*.
6. La respuesta de la microglía, a la leptina y al estradiol, al menos *in vitro*, depende de su estado de activación, lo que puede ayudar a explicar resultados controvertidos en la literatura, indicando que ambas hormonas pueden tener un efecto inflamatorio y antiinflamatorio.

7. En el cerebelo, la ovariectomía, la acción proinflamatoria del LPS y los compuestos estrogénicos modulan de distinta forma el sistema de la IL-6 y su receptor en las células de glía de la sustancia blanca y en las neuronas de Purkinje. Esto sugiere que la IL-6 está desempeñando funciones distintas en los diferentes tipos celulares de esta región cerebral.
8. En la sustancia blanca del cerebelo, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyen la activación microglial, sugiriendo que estos SERMs podrían tener utilidad terapéutica para disminuir la inflamación cerebral.
9. El receptor de estrógenos ER $\alpha$  participa en la regulación de la activación de la microglía en el cerebelo.
10. La duración de la privación de las hormonas ováricas afecta a la activación microglial y a su respuesta frente a los compuestos estrogénicos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abreu P, Llorente E, Hernández MM and González MC, 1994. Interleukin-1 beta stimulates tyrosine hydroxylase activity in the median eminence. *Neuroreport* 5(11):1356-8.

Ahima RS and Flier JS, 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-37. Review.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E and Flier JS, 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252.

Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB and Scherer PE, 2006. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* 55:S145-54. Review.

Ahmed ST and Ivashkiv LB, 2000. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* 165:5227-37.

Ahmed TA, Buzzelli MD, Lang CH, Capen JB, Shumate ML, Navaratnarajah M, Nagarajan M and Cooney RN, 2007. Interleukin-6 inhibits growth hormone-mediated gene expression in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1793-803.

Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J and Thorburn AW, 2001. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obesity* 25:1680-1688.

Alonso A, Fernández R, Moreno M, Ordóñez P, Díaz F and González C, 2007. Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:542-9.

Anand BK and Brobeck JR, 1951a. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77:323-4.

Anand BK and Brobeck JR, 1951b. Hypothalamic controls of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123-39.

Arend WP, Malyak M, Smith MF Jr, Whisenand TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG and Dower SK, 1994. Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol* 153:4766-74.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A and Karin M, 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF-kB activity through induction of I-kB synthesis. *Science* 270:286-290.

Austyn JM and Gordon S, 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11:805-15.

Baker AE, Brautigam VM and Watters JJ, 2004. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 145:5021-32.

Ball GG, Micco DJ Jr and Berntson GG, 1974. Cerebellar stimulation in the rat: complex stimulation-bound oral behaviors and self-stimulation. *Physiol Behav* 13:123-7.

Banks WA, Kastin AJ and Broadwell RD, 1995. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2:241-8. Review.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB and Maness LM, 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17:305-11.

Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR and Kastin AJ, 1991. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 259:988-996.

Banner LR, Moayeri NN and Patterson PH, 1997. Leukemia inhibitory factor is expressed in astrocytes following cortical brain injury. *Exp Neurol* 147:1-9.

Barbanel G, Ixart G, Szafarczyk A, Malaval F and Assenmacher I, 1990. Intrahypothalamic infusion of interleukin-1b increases the release of corticotropin-releasing hormone (CRH 41) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in free-moving rats bearing a push-pull cannula in the median eminence. *Brain Res* 516:31-36.

Barr VA, Lane K and Taylor SI, 1999. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 274: 21416-21424.

Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM and Garcia-Ovejero D, 2007. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci* 25:3039-46.

Baskin DG, Hahn TM and Schwartz MW, 1999. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31:345-350.

Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J and Hainque B, 2002. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084-9.

Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG and Dijkstra CD, 1994. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research* 38:365-375.

Baulieu EE and Schumacher M, 2000. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Hum Reprod* 15:1-13. Review.

Baumann H and Gauldie J, 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15:74-80.

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF and Tartaglia LA, 1996. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8374-8.

Beato M, 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.

Beato M and Klug J, 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-236.

Beato M, Chavez S, and Truss M, 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61: 240-51.

Beato M, Herrlich P and Schütz G, 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* Dec 83:851-7. Review.

Beatty WW, O'Brian DA and Vilberg TR, 1975. Effects of ovariectomy and estradiol injections on food intake and body weight in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 3:539-544.

Beck B, 2000. Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 16:916-23.

Bengtsson AK, Ryan EJ, Giordano D, Magaletti DM and Clark EA, 2004. 17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 104:1404-10.

Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, and Wunderlich F, 1999a. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* 13:123-133.

Benten WP, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, and Wunderlich F, 1999b. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-ree macrophages. *Mol Biol Cell* 10:3113-3123.

Benveniste EN, 1997. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75:165-73. Review.

Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE and Fuller GM, 1990. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 30:201-12.

Benvenuti S, Luciani P, Vannelli GB, Gelmini S, Franceschi E, Serio M and Peri A, 2005. Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:1775-1782.

Berkenbosch F, Oers JV, Rey AD, Tilders F and Besedovsky H, 1987. Corticotropin-releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238:524-526.

Bernardini R, Kamilaris TC, Calogero AE, Johnson EO, Gomez MT, Gold PW and Chrousos GP, 1990. Interactions between tumor necrosis factor alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 126:2876-2881.

Bernardis LL, 1985. Ventromedial and dorsomedial hypothalamic syndromes in the weanling rat: is the "center" concept really outmoded?. *Brain Res Bull* 14:537-49. Review.

Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, McGann-Maloney E, Perlman JA and Ford L, 1999. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 91:1654-1662.

Berthoud HR and Neuhuber WL, 2000. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85:1-17. Review.

Beyer C, Pawlak J and Karolczak M, 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Journal of Neurochemistry* 87:545-550.

Bi S, Robinson BM and Moran TH, 2003. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1030-6.

Biewenga E, Cabell L and Audesirk T, 2005. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neuroscience Letters* 373:179-183.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W and Sawchenko PE, 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319:218-45.

Bjørbaek C and Kahn BB, 2004. Leptin Signaling in the Central Nervous System and the Periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-31. Review.

Bjørbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD and Flier JS, 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-65.

Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL and Flier JS, 1998. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*. 139:3485-91.

Blatteis CM, 1992. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res*, 91:409-412.

Block ML, Zecca L and Hong JS, 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience* 8:57-69.

Boghossian S, Lecklin A, Dube MG, Kalra PS and Kalra SP, 2006. Increased leptin expression in the dorsal vagal complex suppresses adiposity without affecting energy intake and metabolic hormones. *Obesity (Silver Spring)* 14:1003-9.



- Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS and Kalra SP, 1994. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134:2367-70.
- Borges BC, Antunes-Rodrigues J, Castro M, Bittencourt JC, Elias CF and Elias LL, 2007. Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of pituitary-adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. *Horm Behav* 52:508-19.
- Bornstein SR, Preas HL, Chrousos GP and Suffredini AF, 1998. Circulating leptin levels during acute experimental endotoxemia and antiinflammatory therapy in humans. *J Infect Dis* 178:887-890.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW and Tracey KJ, 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458-62.
- Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL and Mahesh VB, 1999. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 64:659-63.
- Bray GA, 2000. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc* 59:373-84. Review.
- Brinton RD, 2004. Requirements of a brain selective estrogen: advances and remaining challenges for developing a NeuroSERM. *Journal of Alzheimer's. Disease* 6:S27-S35.
- Broad KD, Kendrick KM, Sirinathsinghji DJ and Keverne EB, 1993. Changes in proopiomelanocortin and pre-proenkephalin mRNA levels in the ovine brain during pregnancy, parturition and lactation and in response to oestrogen and progesterone. *J Neuroendocrinol* 5:711-719.
- Brobeck JR, 1946. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev* 26:541-59.
- Bruce-Keller AJ, 1999. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58:191-201.
- Bruce-Keller AJ, Barger SW, Moss NI, Pham JT, Keller JN and Nath A, 2001. Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 beta-estradiol. *Journal of Neurochemistry* 78:1315-1324.
- Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S and Mattson MP, 2000. Anti-inflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141:3646-3656.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA and Carlquist M, 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753-8.
- Bulun SE, 2000. Aromatase deficiency and estrogen resistance: from molecular genetics to clinic. *Semin Reprod Med* 18: 31-39. Review.

- Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I and Salas-Salvado J, 2003. Systemic inflammation adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res* 11:525-531.
- Busso N, So A, Chobaz-Péclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D and Gabay C, 2002. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol* 168:875-82.
- Butera PC and Beikirch RJ, 1989. Central implants of diluted estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. *Brain Res* 491:266-73.
- Buttini M, Limonta S and Boddeke HW, 1996. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochemistry International* 29:25-35.
- Buyse M, Ovesjö ML, Goïot H, Guilmeau S, Péranzi G, Moizo L, Walker F, Lewin MJ, Meister B and Bado A, 2001. Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* 14:64-72.
- Cadelli DS, Bandtlow CE and Schwab ME, 1992. Oligodendrocyte- and myelinassociated inhibitors of neurite outgrowth: their involvement in the lack of CNS regeneration. *Exp Neurol* 115:189-192.
- Cammermeyer J, 1965. Juxtavascular karyokinesis and microglia cell proliferation during retrograde reaction in the mouse facial nucleus. *Ergeb Anat Entwickl Gesch* 38:1-22.
- Caprio M, Fabbri E, Isidori AM, Aversa A and Fabbri A, 2001. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 12: 65-72. Review.
- Carlson CD, Bai Y, Jonakait GM and Hart RP, 1996. Interleukin-1 beta increases leukemia inhibitory factor mRNA levels through transient stimulation of transcription rate. *Glia* 18:141-51.
- Carlson CD y Hart RP, 1996. Activation of acidic sphingomyelinase and protein kinase C zeta is required for IL-1 induction of LIF mRNA in a Schwann cell line. *Glia* 18:49-58.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, and O'Malley BW, 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11:201-20. Review.
- Catalano S, Mauro L, Marsico S, Giordano C, Rizza P, Rago V, Montanaro D, Maggiolini M, Panno ML and Andó S, 2004. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J Biol Chem* 279:19908-15.
- Catania A, Lipton JM, 1993. Catania A and Lipton JM, 1993. alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr Rev* 14, 564-576. Review.

- Cenni B and Picard D, 1999. Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. *Trends Endocrinol Metab* 10:41-46.
- Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM and Arevalo MA, 2010. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia* 58:93-102.
- Chaban VV, Lakhter AJ, and Micevych P, 2004. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology* 145:3788-3795.
- Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V and Bartfai T, 1996. Interleukin(IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1beta: A study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* 183:311-316.
- Chakraborty S, Sachdev A, Salton SR and Chakraborty TR, 2008. Stereological analysis of estrogen receptor expression in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob and agouti mice. *Brain Res* 1217:86-95.
- Chakraborty TR, Hof PR, Ng L and Gore AC, 2003. Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J Comp Neurol* 466:409-21.
- Chamak B, Morandi V and Mallat M, 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* 38:221-233.
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, and Shaul PW, 2002. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 16:938-946.
- Chance WT, Sheriff S, Dayal R and Balasubramaniam A, 2003. Refractory hypothalamic alpha-mSH satiety and AGRP feeding systems in rats bearing MCA sarcomas. *Peptides* 24:1909-19.
- Chaudhri OB, Parkinson JR, Kuo YT, Druce MR, Herlihy AH, Bell JD, Dhillon WS, Stanley SA, Ghatei MA and Bloom SR, 2006. Differential hypothalamic neuronal activation following peripheral injection of GLP-1 and oxyntomodulin in mice detected by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 350:298-306.
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R and Lim ME, 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88-90.
- Cheleuitte D, Mizuno S and Glowacki J, 1998. In vitro secretion of cytokines by human bone marrow: Effects of age and estrogen status. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2043-2051.

Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY and Van der Ploeg LHT, 2000. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 26:97-102.

Cheng B, Christakos S and Mattson MP, 1994. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153.

Cheung J and Smith DF, 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14:939-946.

Cheunsuang O and Morris R, 2005. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Glia* 52:228-33.

Choi JS, Park HJ, Cha JH, Chung JW, Chun MH and Lee MY, 2003. Induction and temporal changes of osteopontin mRNA and protein in the brain following systemic lipopolysaccharide injection. *Journal of Neuroimmunology* 141:65-73.

Chomczynski P and Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.

Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC and Chou FP, 1999. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64:2299-2306.

Ciesielska A, 2003. Immunosuppressive aspects of estrogen. *Neurol Neurochir Pol* 3:79-92.

Cintra DE, Ropelle ER and Pauli JR, 2007. Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise. *Rev Neurol* 45:672-82.

Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prévot V and Levine JE, 2009. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150:5509-19.

Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG and Garcia-Segura LM, 2004. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *Journal of Neurobiology* 61:209-221.

Colmers WF and Wahlestedt C, 1993. The biology of neuropeptide Y and related peptides. New Jersey: Humana Press Inc.

Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS and O'Rahilly S, 2004. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2557-2562.

- Combrinck MI, Perry VH and Cunningham C, 2002. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112: 7-11.
- Cone RD, 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-8. Review.
- Cooney RN, 2002. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17:83-90. Review.
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, and Parker MG, 1997. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272:19858-19862.
- Crespo MA, González Matías LC, Lozano MG, Paz SF, Pérez MR, Gago EV and Ferrer FM, 2009. Gastrointestinal hormones in food intake control. *Endocrinol Nutr* 56:317-30.
- Cui H, Cai F and Belsham DD, 2006. Leptin signaling in neurotensin neurons involves STAT, MAP kinases ERK1/2, and p38 through c-Fos and ATF1. *FASEB J* 20:2654-6.
- Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K and Perry VH, 2005. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* 25: 9275-9284.
- Cyr M, Calon F, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T and Callier S, 2000. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Current Pharmaceutical Design* 6:1287-1312.
- Czlonkowska A, Ciesielska A, Gromadzka G and Kurkowska-Jastrzebska I, 2005. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr Pharm Des* 11:1017-30.
- Dai X, Chen L and Sokabe M, 2007. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* 52:1124-38.
- Dallaporta M, Pecchi E, Pio J, Jean A, Horner KC and Troadec JD, 2009. Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *J Neuroendocrinol* 21:57-67.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW and Kelley KW, 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-56. Review.
- Darnell JE Jr, Kerr IM and Stark GR, 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415.

- Das SK, Taylor JA, Korach KS, Paria BC, Dey SK, and Lubahn DB, 1997. Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12786-12791.
- Das UN, 2001. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 17:953-66. Review.
- De Giorgio MR, Yoshioka M and St-Amand J, 2009. Feeding induced changes in the hypothalamic transcriptome. *Clin Chim Acta* 406:103-7.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ and Velloso LA, 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199.
- De Souza CT, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Morari J, Alvarez-Rojas F, Bordin S, Moreira-Filho DC, Carnevalheira JB, Saad MJ and Velloso LA, 2008: Distinct subsets of hypothalamic genes are modulated by two different thermogenesis-inducing stimuli. *Obesity (Silver Spring)* 16:1239-1247.
- De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270:15958–15961, 1995.
- Delgado M, Leceta J and Ganea DJ, 2003. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclaseactivating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *Leukoc Biol* 73:155-64.
- Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D, Baron P, Lipton JM and Catania A, 1998. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* 63:740-5.
- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ and Oertel WH, 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 18: 2731-2742.
- Dhandapani KM and Brann DW, 2002. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biology of Reproduction* 67:1379-1385.
- Diano S, Kalra SP, Sakamoto H and Horvath TL, 1998. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res* 812: 256-259.
- Diehl S, Chow CW, Weiss L, Palmethofer A, Twardzik T, Rounds L, Serfling E, Davis RJ, Anguita J and Rincon M, 2002. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J Exp Med* 196:39-49.
- Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, Wang C, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Perger A, Wilson ME, Keller JN and Bruce-Keller AJ, 2005. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *Journal of Neuroimmunology* 161:123-136.

Dishman RK, 1997. Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models. *Med Sci Sports Exerc* 29:63-74.

Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Müllberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC and Graeve L, 1994. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* 269:19014-20.

Dixit VD, 2008. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *J Leukoc Biol* 84:882-92.

Dixit VD, Mielenz M, Taub DD and Parvizi N, 2003. Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide dependent mechanism. *Endocrinology* 144: 5595-5603.

DonCarlos LL, Azcoitia I and Garcia-Segura LM, 2007. In search of neuroprotective therapies based on the mechanisms of estrogens. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2:387-397.

Dozio E, Ruscica M, Galliera E, Corsi MM and Magni P, 2009. Leptin, ciliary neurotrophic factor, leukemia inhibitory factor and interleukin-6: class-I cytokines involved in the neuroendocrine regulation of the reproductive function. *Curr Protein Pept Sci* 10:577-84. Review.

Drew PD and Chavis JA, 2000. Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *Journal of Neuroimmunology* 111:77-85.

Du B, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohshima C, Igarashi H, Mori-Abe A, Saitoh M, Ohta T, Ohishi A, Doshida M, Tezuka N, Takahashi T and Kurachi H, 2004. Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrinol* 183:605-15.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM and Karsenty G, 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197-207.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P and Mark M, 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277-91.

Edwards CKI, 1999. PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I(r-IIu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases. *Ann Rheum Dis* 58:173-181.

Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T and Ericsson A, 1998. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci* 18:9471-9479.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjørbaek C, Flier JS, Saper CB and Elmquist JK, 1999. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-786.

Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS and Saper CB, 1998. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:741-6.

Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E and Saper CB, 1997a. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138:839-42.

Elmquist JK and Saper CB, 1996. Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide. *J Comp Neurol* 374: 315-331.

Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D and Saper CB, 1997b. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* 381:119-129.

Engelhardt B, 2006. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results Probl Cell Differ* 43:259-80.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL and Cowley MA, 2007. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5:181-94.

Ericsson A, Arias C and Sawchenko PE, 1997. Evidence for an intramedullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. *J. Neurosci* 17: 7166-7179.

Ericsson A, Liu C, Hart RP and Sawchenko PE, 1995. Type-1 interleukin-1 receptor in the rat brain: Distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* 361:681-698.

Eriksson C, Nobel S, Winblad B and Schultzberg M, 2000. Expression of interleukin 1 a and b, and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in the rat central nervous system after peripheral administration of lipopolysaccharides. *Cytokine* 12: 423-431.

Evans RM, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

Fabrick BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Döpp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P and Dijkstra CD, 2005. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51:297-305.



Fain JN, 2006. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74:443-77. Review.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, and Wehling M, 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556.

Fantuzzi G, and Faggioni R, 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68:437-46. Review.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA and O'Rahilly S, 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341: 879-884.

Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T and Ciliberto G, 1995. IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrogliosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci* 7:2441-9.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R and Friedman JM, 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7001-5.

Feng Y, Fratkins JD and LeBlanc MH, 2004. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *European Journal of Pharmacology* 484: 65-74.

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Böttner M, Jarry H, Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O and Quinn JP, 1996. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cellular and Molecular Neurobiology* 16 325-344.

Fisler JS, Egawa M and Bray GA, 1995. Peripheral 3-hydroxybutyrate and food intake in a model of dietary-fat induced obesity: effect of vagotomy. *Physiol Behav* 58:1-7.

Fisler JS, Shimizu H and Bray GA, 1989. Brain 3-hydroxybutyrate, glutamate, and GABA in a rat model of dietary obesity. *Physiol Behav* 45:571-7.

Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC and Hickey WF, 1993. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7:34-40.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH, 2007. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 298:2028-2037.

Fombonne J, Charrier C, Goddard I, Moyse E and Krantic S, 2007. Leptin-mediated decrease of cyclin A2 and increase of cyclin D1 expression: relevance for the control of prepubertal rat Leydig cell division and differentiation. *Endocrinology* 148:2126-37.

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF and Sedgwick JD, 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4<sup>+</sup> T cells compared. *J Immunol* 154:4309-21.

Frassanito MA, Cusmai A, Iodice G and Dammacco F, 2001. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97:483-489.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB and Flier JS, 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311–1314.

Friedman JM and Halaas JL, 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.

Frisen J, Haegerstrand A, Fried K, Piehl F, Cullheim S and Risling M, 1994. Adhesive/repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp Neurol* 129:183-193.

Fukata J, Usui T, Naitoh Y, Nakai Y and Imura H, 1989. Effects of recombinant human interleukin-1a, -1b, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. *J Endocrinol* 122:33-39.

Gadient RA and Otten U, 1993. Differential expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 153:13-16.

Gadient RA and Otten U, 1994. Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. *Neurosci Lett* 182:243-6.

Gadient RA and Otten U, 1995. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor mRNA expression in rat central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 762:403-406.

Gadient RA and Otten UH, 1997. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52:379-90. Review.

Ganea D, Rodriguez R and Delgado M, 2003. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:127-42.

Ganter S, Northoff H, Männel D and Gebicke-Härter PJ, 1992. Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* 33:218-30.

Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J and Yamada T, 1993. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268:15174–9.

Gao Q and Horvath TL, 2008. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E817-26. Review.

García-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 628:271-8.

García-Estrada J, Luquin S, Fernández AM, and García-Segura LM, 1999. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci* 17:145-151.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I and DonCarlos LL, 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* 63:29-60. Review.

Garrido-Gracia JC, Gordon A, Bellido C, Aguilar R, Barranco I, Millán Y, deLas Mulas JM and Sánchez-Criado JE, 2007. The integrated action of oestrogen receptor isoforms and sites with progesterone receptor in the gonadotrope modulates LH secretion: evidence from tamoxifen-treated ovariectomized rats. *J Endocrinol* 193:107-19.

Gautron L, Mingam R, Moranis A, Combe C and Layé S, 2005. Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Neuroscience* 134:933-46.

Gehrmann J, Matsumoto Y and Kreutzberg GW, 1995. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-87. Review.

Georget V, Terouanne B, Nicolas JC, and Sultan C, 2002. Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* 41:11824-11831.

Ghisletti S, Meda C, Maggi A and Vegeto E, 2005. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF- $\kappa$ B intracellular localization. *Molecular and Cellular Biology* 25:2957-2968.

Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC and Manolagas SC, 1992. 17  $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89:883-91.

Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF and Watkins LR, 2000. Vagal immuneto- brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci*, 85: 49-59.

Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF and Watkins LR, 1999. Interleukin-1 $\beta$  in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 19:2799-2806.

Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF and Watkins LR, 1997. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanism for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull*, 43:357-364.

Golden PL, Maccagnan TJ and Pardridge WM, 1997. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 99:14-8.

Graeber MB, Streit WJ, Büringer D, Sparks DL and Kreutzberg GW, 1992. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:303–311.

Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R, Shoen SW and Kreutzberg GW, 1990. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *Journal of Neuroimmunology* 27:121-132.

Gray TS, O'Donohue TL and Magnuson DJ, 1986. Neuropeptide Y innervation of amygdaloid and hypothalamic neurons that project to the dorsal vagal complex in rat. *Peptides* 7:341-9.

Greenberg AS and Obin MS, 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 83, 461S–465S.

Greene GL and Press MF. 1986. Structure and dynamics of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem* 24:1-7. Review.

Grill HJ and Kaplan JM, 2002. The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 23:2-40. Review.

Grinevich V, Ma XM, Herman JP, Jezova D, Akmayev I and Aguilera G, 2001. Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats. *J Neuroendocrinol* 13:711-23.

Grothe C, Heese K, Meisinger C, Wewetzer K, Kunz D, Cattini Pand and Otten U, 2000. Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18 kD fibroblast growth factor-2. *Brain Res* 885:172-181.

Grotzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M and Rose-John S, 1997. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins* 27:96-109.

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J and Feingold KR, 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 97:2152-7.

Gruol DL and Nelson TE, 2005. Purkinje neuron physiology is altered by the inflammatory factor interleukin-6. *Cerebellum* 4:198-205.

Gu Q, Korach KS, and Moss RL, 1999. Rapid action of 17beta-estradiol on kainite induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* 140:660-666.

Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ and van der Ploeg LH, 1997. Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 133:1-7.

Gueorguiev M, Góth ML and Korbonits M, 2001. Leptin and puberty: a review. *Pituitary* 4:79-86. Review.

Guijarro A, Laviano A and Meguid MM, 2006. Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog Brain Res* 153:367-405.

Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A and Nahon JL, 2009. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides* 30:2031-9.

Guyon A, Massa F, Rovere C and Nahon JL, 2008. How cytokines can influence the brain: a role for chemokines?. *J Neuroimmunol* 198:46-55.

Ha BK and King J, 2000. Localization of gp130 in the developing and adult mouse cerebellum. *J Chem Neuroanat* 19:129-41.

Haddad JJ, Saadé NE and Safieh-Garabedian B, 2002. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol* 133:1-19. Review. Erratum in: *J Neuroimmunol* 2003,145:154.

Hailer NP, Grampp A and Nitsch R, 1999. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 11:3359-64.

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC and Meister B, 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18:559-72.

Handa RJ, Weiser MJ and Zuloaga DG, 2009. A role for the androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, in modulating oestrogen receptor beta-mediated regulation of hormonal stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 21:351-8. Review.

Hanisch UK and Kettenmann H, 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-94. Review.

Hanusch-Enserer U, Cauza E, Spak M, Dunky A, Rosen HR, Wolf H, Prager R and Eibl MM, 2003. Acute-phase response and immunological markers in morbid obese patients and patients following adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:355-61.

Hao J, Cabeza de Vaca S, Pan Y and Carr KD, 2006. Effects of central leptin infusion on the reward-potentiating effect of D-amphetamine. *Brain Res* 1087:123-33.

Harmer SC and Bicknell AB, 2004. The role of the melanocortin 3 receptor in mediating the effects of gamma-MSH peptides on the adrenal. *Endocr Res* 30:629-35.

Harrold JA, Widdowson PS and Williams G, 2003. beta-MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R?. *Peptides* 24:397-405.

Hatton WJ and Von Bartheld CS, 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 409:169-186.

Hawke Z, Ivanov TR, Bechtold DA, Dhillon H, Lowell BB and Luckman SM, 2009. PACAP neurons in the hypothalamic ventromedial nucleus are targets of central leptin signaling. *J Neurosci* 29:14828-35.

Heinlein CA and Chang C, 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16:2181-2187.

Heinrich PC, Castell JV and Andus T, 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-636.

Heinrich PC, Graeve L, Rose-John S, Schneider-Mergener J, Dittrich E, Erren A, Gerhartz C, Hemmann U, Lütticken C, Wegenka U, Weiergräber O and Horn F, 1995. Membrane-bound and soluble interleukin-6 receptor: studies on structure, regulation of expression, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 762:222-237.

Henkel JS, Beers DR, Zhao W and Appel SH, 2009. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:389-98.

Herbison AE, 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19: 302–330. Review.

Herrid M, O'Shea T and McFarlane JR, 2008. Ontogeny of leptin and its receptor expression in mouse testis during the postnatal period. *Mol Reprod Dev* 75:874-80.

Hetherington AW and Ranson SW, 1942. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J Comp Neurol* 76:475– 99.

Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E and Thoenen H, 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8735-8739.

Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D and Nicola NA, 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:114–119.

Hirahara Y, Matsuda K, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, Boggs JM, 2009. The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia* 57:153-65.

Hirano T, Nakajima K and Hibi M, 1997. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:241-252.

- Hoebel BG, 1971. Feeding: neural control of intake. *Annu Rev Physiol* 33:533-68.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN and Sedgwick JD, 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768-1771.
- Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Fowler PA, Huppertz B, Jugert JF, Bischoff G, Schlüter E, Buchmann J and Klonisch T, 2005. Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 34:517-34.
- Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ and Peiper SC, 1997. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* 158:2882-90.
- Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS and Deleo JA, 2008. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* 107:557-69.
- Horvath TL, 2005. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8:561-5. Review.
- Hosoi T, Okuma Y and Nomura Y, 2000. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 $\beta$  expression in the brain and activates HPA axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279:R141-R147.
- Hotamisligil GS, 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Howard CV and Reed MG, 1998. *Unbiased Stereology*. Ed Bios Scientific Publishers (UK).
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjørbaek C and Flier JS, 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734-8.
- Hung AJ, Stanbury MG, Shanabrough M, Horvath TL, Garcia-Segura LM and Naftolin F, 2003. Estrogen, synaptic plasticity and hypothalamic reproductive aging. *Exp Gerontol* 38:53-9. Review.
- Hunt JS, Miller L, Roby KF, Huang J, Platt JS and DeBrot BL, 1997. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. *J Reprod Immunol* 35:87-99. Review.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P and Lee F, 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141.

Hutchison JB, 1991. Hormonal control of behaviour: steroid action in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 1:562-570.

Hutchison JB, Beyer C, Green S and Wozniak A, 1994. Brain formation of oestrogen in the mouse: sex dimorphism in aromatase development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:407-15. Review.

Iannone F and Lapadula G, 2010. Obesity and inflammation--targets for OA therapy. *Curr Drug Targets* 11:586-98.

Ichihara M, Hara T, Kim H, Murate T and Miyajima A, 1997. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood* 90:165-173.

Ihle JN, 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377:591-4. Review.

Inoue W, Poole S, Bristow AF and Luheshi GN, 2006. Leptin induces cyclooxygenase-2 via an interaction with interleukin-1beta in the rat brain. *Eur J Neurosci* 24:2233-45.

Isidori AM, Strollo F, More M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, Frajese G Riondino G and Fabbri A, 2000. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1954-1962.

Ivashkiv LB, 1996. Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis. *Adv Immunol* 63:337-76. Review.

Jellinck PH, Croft G, McEwen BS, Gottfried-Blackmore A, Jones G, Byford V and Bulloch K, 2005. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rodent brain cell lines: relationship between 7-hydroxylation and aromatization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:81-6.

Jellinck PH, Kaufmann M, Gottfried-Blackmore A, McEwen BS, Jones G and Bulloch K, 2007. Selective conversion by microglia of dehydroepiandrosterone to 5-androstenediol-A steroid with inherent estrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 107:156-62.

Jiang C, Fogel R and Zhang X, 2003. Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. *Brain Res* 980:31-47.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H and Manolagas SC, 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257:88-91.

Johnson RW, 1998. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domest Anim Endocrinol* 15:309-19. Review.

Juliet PA, Mao X, and Del Bigio MR, 2008. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. *Brain Res* 1210:230-9.



- Jung-Testas I, Alliot F, Pessac B, Robel P and Baulieu EE, 1989. Immunocytochemical localization of cytochrome P-450<sub>scc</sub> in cultured rat oligodendrocytes. *CR Acad Sci III* 308:165-170.
- Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, and Rosner W, 2002. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol* 175:113-120.
- Kalra PS, Edwards TG, Xiu B, Jain M and Kalra SP, 1998. The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domestic Animal Endocrinology* 15 321-332.
- Kamimura D, Ishihara K and Hirano T, 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149:1-38.
- Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR and Trevillyan JM, 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 195:109-18.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, et al., 1988. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332:83-85.
- Kelly MJ and Levin ER, 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12:152-156.
- Kelly MJ, Qiu J and Ronnekleiv OK, 2005. Estrogen signaling in the hypothalamus. *Vitamins and Hormones* 71:123-145.
- Kendall NR, Gutierrez CG, Scaramuzzi RJ, Baird DT, Webb R and Campbell BK, 2004. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 128:757-65.
- Kennedy GC, 1950. The hypothalamic control of food intake in rats. *Proc R Soc* 137:535-49.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L and Ranganathan G 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-751.
- Kershaw EE and Flier JS, 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-56. Review.
- Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y and Kishioka S, 2009. Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem Biophys Res Commun* 384:311-5.
- Kim JH, Bachmann RA and Chen J, 2009. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm* 80:613-33.

Kim JJ and Diamond DM, 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Rev Neurosci* 3:453-462. Review.

Kim JK, 2006. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab* 4:417-419.

Kim SU and de Vellis J, 2005. Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research* 81:302-313.

Kim WK, Alvarez X, Fisher J, Bronfin B, Westmoreland S, McLaurin J and Williams K, 2006. CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am J Pathol* 168:822-834.

Kimelberg HK, Jin Y, Charniga C and Feustel PJ, 2003. Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia. *Journal of Neurosurgery* 99:138-142.

Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M and Aono T, 2002. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1349-1353.

Kishimoto T, 1994. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* 1:37-44; discussion 44-5.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M and Taga T, 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, and Ryffel GU, 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 46:1053-61.

Klein JP, Hains BC, Craner MJ, Black JA and Waxman SG, 2004. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. *Neurobiol Dis.* 15:221-8.

Klinge CM, 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65:227-51. Review.

Koç E, Ustündağ G, Aliefendioğlu D, Ergenekon E, Bideci A and Atalay Y, 2003. Serum leptin levels and their relationship to tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in neonatal sepsis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16:1283-7.

Konsman JP, Luheshi GN, Bluthé RM and Dantzer R, 2000. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci* 12:4434-46.

Konsman JP, Vigues S, Mackerlova L, Bristow A and Blomqvist A, 2004. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* 472:113-129.

Kopelman PG, 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635–643. Review.

Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R and Schernthaner G, 2003. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1042-7.

Korner J, Savontaus E, Chua Jr SC, Leibel RL and Wardlaw SL, 2001. Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 13:959-966.

Kozak W, Poli V, Soszynski D, Conn CA, Leon LR and Kluger MJ, 1997. Sickness behavior in mice deficient in interleukin-6 during turpentine abscess and influenza pneumonitis. *Am J Physiol* 272:R621-30.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ and Hastrup S, 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-6.

Krueger J, Ray A, Tamm I and Sehgal PB, 1991. Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *J Cell Biochem* 45:327-34. Review.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson JA, 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930.

Kurrasch DM, Cheung CC, Lee FY, Tran PV, Hata K and Ingraham HA, 2007. The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci* 27:13624-34.

La Cava A and Matarese G, 2004. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4:371-9. Review.

Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I and Finsen B, 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research. Brain Research Reviews* 48:196–206.

Lafrance V, Inoue W, Kan B and Luheshi GN, 2010. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain Behav Immun* 24:358-65.

Lagrange AH, Ronnekleiv OK, and Kelly MJ, 1995. Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology* 136:2341-2344.

Lai AY and Todd KG, 2008. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56:259-70.

Laimer M, Ebenbichler CF, Kaser S, Sandhofer A, Weiss H, Nehoda H, Aigner F and Patsch JR, 2002. Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:659-62.

Lam QL and Lu L, 2007. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 4:1-13. Review.

Langhans W, Egli G and Scharrer E, 1985. Regulation of food intake by hepatic oxidative metabolism. *Brain Res Bull* 15:425-8.

Laye S, Parnet P, Goujon E and Dantzer R, 1994. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Research. Molecular Brain Research* 27:157-162.

Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gérard A, Parent AS and Bourguignon JP, 2000. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinol* 12:383-5. Review.

Lee YB, Nagai A and Kim SU, 2002. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69:94-103.

Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, Wraight V, Sims M, Vatin V, Meyre D, Shield J, Burren C, Ibrahim Z, Cheetham T, Swift P, Blackwood A, Hung CC, Wareham NJ, Froguel P, Millhauser GL, O'Rahilly S and Farooqi IS, 2006. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* 3:135-140.

Lehrke M and Lazar MA, 2004. Inflamed about obesity. *Nat Med* 10:126-7.

Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK and Mouton PR, 2003. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience* 121:659-666.

Lephart ED and Ojeda SR, 1990. Hypothalamic aromatase activity in male and female rats during juvenile peripubertal development. *Neuroendocrinology* 51:385-93.

Levin BE and Dunn-Meynell AA, 2002. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R46-54.

Levine AS and Morley JE, 1984. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5:1025-9.

Li L, Haynes MP, and Bender JR, 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4807-4812.

Lindberg C, Hjorth E, Post C, Winblad B and Schultzberg M, 2005. Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neurotox Res* 8:267-76.

Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, and Ohlsson C, 2003. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-8.

Lindblom J, Schiöth HB, Larsson A, Wikberg JE and Bergström L, 1998. Autoradiographic discrimination of melanocortin receptors indicates that the MC3 subtype dominates in the medial rat brain. *Brain Res* 810:161– 71.

Lipnik-Stangelj M and Carman-Krzan M, 2005. Histamine and IL-6 interaction in the stimulation of nerve growth factor secretion from cultured astrocytes. *Inflamm Res*. Apr;54 Suppl 1:S36-7.

Lipton JM and Catania A, 1997. Antiinflammatory influence of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 18, 140–145.

Lipton JM, Ceriani G, Macaluso A, McCoy D, Carnes K, Biltz J and Catania A, 1994. Antiinflammatory effects of the neuropeptide alpha-MSH in acute, chronic, and systemic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 741:137-48.

Littleton-Kearney MT, Ostrowski NL, Cox DA, Rossberg MI and Hurn PD, 2002. Selective estrogen receptor modulators: tissue actions and potential for CNS protection. *CNS Drug Reviews* 8:309-330.

Liu X, Fan XL, Zhao Y, Luo GR, Li XP, Li R and Le WD, 2005. Estrogen provides neuroprotection against activated microglia-induced dopaminergic neuronal injury through both estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in microglia. *J Neurosci Res* 81:653-65.

Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD and Diehl AM, 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12:57-65.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR and Lechler RI, 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901.

Lotan M, Solomon A, Ben Bassat S and Schwartz M, 1994. Cytokines modulate the inflammatory response and change permissiveness to neuronal adhesion in injured mammalian central nervous system. *Exp Neurol* 126:284-290.

Lukaszuk K, Liss J, Kusiak E and Wojcikowski C, 1998. Serum leptin concentration increase during luteal phase in healthy premenopausal women. *Horm Metab Res* 30:172-173.

Lyson K and McCann SM, 1991. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 54:262-6.

MacDougald OA, Hwang CS, Fan H and Lane MD, 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9034-7.

Machinal F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R and Giudicelli Y, 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 140:1567-1574.

MacLusky NJ and Naftolin F, 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211:1294-1302.

MacPhedran SE and Hall AK, 2001. Influence of non-neuronal cells on establishment of neuropeptide Y expression by sympathetic neurons in vitro. *Dev Neurosci* 23:307-17.

Maggi A, Ciana P, Belcredito S and Vegeto E, 2004. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annual Review of Physiology* 66:291-313.

Mahaut S, Dumont Y, Fournier A, Quirion R and Moyse E, 2010. Neuropeptide Y receptor subtypes in the dorsal vagal complex under acute feeding adaptation in the adult rat. *Neuropeptides* 44:77-86.

Mahony SM and Tisdale MJ, 1998. Induction of weight loss and metabolic alterations by human recombinant tumour necrosis factor. *Br J Cancer* 58:345-349.

Maki PM, 2005. A systematic review of clinical trials of hormone therapy on cognitive function: effects of age at initiation and progestin use. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1052:182-197.

Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW and Huffnagle GB, 2002. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol* 168: 4018-4024.

Mann DR and Plant TM, 2002. Leptin and pubertal development. *Semin Reprod Med* 20:93-102. Review.

Manolagas SC and Jilka RL, 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 332:305-311.

- Mansour E, Pereira FG, Araújo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR, Ferreira DS, Lorand-Metze I and Velloso LA, 2006. Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 147:5470-9.
- Marchetti B and Abbracchio MP, 2005. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?. *Trends in Pharmacological Sciences* 26:517-525.
- Marin R, Guerra B, Alonso R, Ramirez CM and Diaz M, 2005. Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Current Neurovascular Research* 2:287-301.
- Martin-Romero C and Sánchez-Margalet V, 2001. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 212:83-91.
- Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T and Yoshimatsu H, 2003. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology* 144:3547- 54.
- Mascarucci P, Perego C, Terrazzino S and De Simoni MG, 1998. Glutamate release in the nucleus tractus solitarius induced by peripheral lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Neuroscience* 86:1285-1290.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD and Matsushima GK, 2001. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 21:7046-7052.
- Mastronardi CA, Srivastava V, Yu WH, Les Dees W and McCann SM, 2005. Lipopolysaccharide-induced leptin synthesis and release are differentially controlled by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neuroimmunomodulation* 12:182-8.
- Matarese G, Sanna V, Lechler RI, Sarvetnick N, Fontana S, Zappacosta S and La Cava A, 2002. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. *Diabetes* 51:1356-61.
- Matta SG, Weatherbee J and Sharp BM, 1992. A central mechanism is involved in the secretion of ACTH in response to IL-6 in rats: comparison to and interaction with IL-1 beta. *Neuroendocrinology* 56:516-25.
- McCluskey LP and Lampson LA and 2000. Local neurochemicals and site-specific immune regulation in the CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:177-187.
- McEwen BS and Alves SE, 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279-307. Review.
- McKenna NJ, Lanz RB, and O'Malley BW, 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-44.

McKenna NJ, and O'Malley BW, 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-74.

McKinley MJ and Oldfield BJ, 1998. The brain as an endocrine target for Peptide hormones. *Trends Endocrinol Metab* 9:349-54.

McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A and Oldfield BJ, 2003. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172:1-122. Review.

McMenamin PG, 1999. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* 405:553–562.

Mehta SH, Dhandapani KM, De Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB and Brann DW, 2003. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology* 77:44-50.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT and Trayhurn P, 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387:113-6.

Mercer JG, Moar KM and Hoggard N, 1998. Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology* 139:29-34.

Metzger S, Hassin T, Barash V, Pappo O and Chajek-Shaul T, 2001. Reduced body fat and increased hepatic lipid synthesis in mice bearing interleukin-6-secreting tumor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E957-65.

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS and Katzenellenbogen JA, 2001. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* 44:4230-51.

Micevych P, Kuo J and Christensen A, 2009. Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction. *J Neuroendocrinol* 21:249-56.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad J and Velloso LA, 2009. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29:359-70.

Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzalez JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al., 1990. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4068-4072.



Miller VM, Clarkson TB, Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Naftolin F and Santoro N, 2005. Women, hormones, and clinical trials: a beginning, not an end. *Journal of Applied Physiology* 99:381-383.

Millington GW, 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 4:18. Review.

Millington GW, Tung YC, Hewson AK, O'Rahilly S and Dickson SL, 2001. Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat. *Neuroscience* 108:437-45.

Minghetti L, 2005. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurology* 18:315-321.

Minghetti L and Levi G, 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 54:99-125.

Mize AL, Young LJ, and Alper RH, 2003. Uncoupling of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the brain by estrogens: regional variations in antagonism by ICI 182,780. *Neuropharmacology* 44:584-591.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S and Coppel SW, 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200.

Moller T, Hanisch UK and Ransom BR, 2000. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75:1539-1547.

Molnar EL, Hegyesi H, Toth S, Darvas Z, Laszlo V, Szalai C and Falus A, 2000. Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma-derived histamine. *Semin Cancer Biol* 10:25-28.

Moore SI, Huffnagle GB, Chen GH, White ES and Mancuso P, 2003. Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 71:4182-5.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS and Schwartz MW, 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-95. Review.

Morton GJ, Mystkowski P, Matsumoto AM and Schwartz MW, 2004. Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides* 25:667-674.

Moshage H, 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 181:257-266.

Moss RL and Gu Q, 1999. Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids* 64:14-21.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB and Cone RD, 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8:1298–308.

Munck A, Guyre PM and Holbrook NJ, 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5: 25-44.

Munzberg H, Flier JS and Bjørbaek C, 2004. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145:4880–4889.

Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K and Kishimoto T, 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167:332-344.

Murphy S, McCullough L, Littleton-Kearney M and Hurn P, 2003. Estrogen and selective estrogen receptor modulators: neuroprotection in the Women's Health Initiative era. *Endocrine* 21:17-26.

Murray JF, Mercer JG, Adan RA, Datta JJ, Aldairy C, Moar KM, Baker BI, Stock MJ and Wilson CA, 2000. The effect of leptin on luteinizing hormone release is exerted in the zona incerta and mediated by melanin-concentrating hormone. *J Neuroendocrinol* 12:1133-9.

Mystkowski P, Seeley RJ, Hahn TM, Baskin DG, Havel PJ, Matsumoto AM, Wilkinson CW, Peacock-Kinzig K, Blake KA and Schwartz MW, 2000. Hypothalamic melanin-concentrating hormone and estrogen-induced weight loss. *J Neurosci* 20:8637-8642.

Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, and Soria B, 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11603-11608.

Nadeau S and Rivest S, 1999. Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood–brain barrier. *Neuroscience* 93:1449-1464.

Nadeau S and Rivest S, 2000. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 20:3456-68.

Nakajima K and Kohsaka S, 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem* 130 :169-75. Review.

Nelson TE, Campbell IL and Gruol DL, 1999. Altered physiology of Purkinje neurons in cerebellar slices from transgenic mice with chronic central nervous system expression of interleukin-6. *Neuroscience* 89:127-36.

- Nesbitt JE and Fuller GM, 1992. Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267:5739-5742.
- Neumann H, Boucraut J, Hahnel C, Misgeld T and Wekerle H, 1996. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci* 8:2582-2590.
- Ng YK and Ling EA, 1997. Induction of major histocompatibility class II antigen on microglial cells in postnatal and adult rats following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Neuroscience Research* 28:111-118.
- Nguyen MD, Julien JP and Rivest S, 2002. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?. *Nat Rev Neurosci* 3:216-227.
- Nicholson SE and Hilton DJ, 1998. The SOCS proteins: A new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63:665-668.
- Nijijima A, 1983. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and their role in food intake and blood glucose regulation. *J Auton Nerv Syst* 9:207-20.
- Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr and Schwartz MW, 2001. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413:794-5.
- Norris JD, Paige LA, Christensen DJ, Chang CY, Huacani MR, Fan D, Hamilton PT, Fowlkes DM and McDonnell DP, 1999. Peptide antagonists of the human estrogen receptor. *Science* 285:744-746.
- Norsted E, Gömüç B and Meister B, 2008. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36:107-21.
- Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, and Furukawa Y, 2008. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomed Res* 29:163-70.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I and Barsh GS, 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-8. Erratum in: *Science* 1998, 281:1615.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW, 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-7.
- Ono T, Steffens AB and Sasaki K, 1983. Influence of peripheral and intracerebroventricular glucose and insulin infusions on peripheral and cerebrospinal fluid glucose and insulin levels. *Physiol Behav* 30:301-306.
- Oomura Y, 1981. Chemosensitive neuron in the hypothalamus related to food intake behavior. *Jpn J Pharmacol* 31 Suppl:1P-12P.

Opara EI, Meguid MM, Yang ZJ, Chai JK and Veerabagu M, 1995. Tumor necrosis factor-alpha and total parenteral nutrition-induced anorexia. *Surgery* 118:756-62.

Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z and Chrousos GP, 1999. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2126-33.

Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS and Sakuma Y, 2002. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3306-11.

Ormerod BK and Galea LA, 2001. Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience* 102:369-79.

Pacifici R, 1996. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11:1043–1051.

Pacifici R, 1998. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis the second decade. *Endocrinology* 139: 2659-61.

Paige LA, Christensen DJ, Grøn H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, Chang CY, Ballas LM, Hamilton PT, McDonnell DP and Fowlkes DM, 1999. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3999-4004.

Palacios S, Farias ML, Luebbert H, Gomez G, Yabur JA, Quail DC, Turbi C, Kayath MJ, Almeida MJ, Mönnig E and Nickelsen T, 2004. Raloxifene is not associated with biologically relevant changes in hot flushes in postmenopausal women for whom therapy is appropriate. *Am J Obstet Gynecol* 191:121-31.

Passeri G, Girasole G, Jilka RL and Manolagas SC, 1993. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* 133:822-8.

Paxinos G and Watson C, 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.

Paxinos G and Watson C, 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic.

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E and Febbraio M, 2004. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc* 63:263-7. Review.

Pekny M and Nilsson M, 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.

- Pelletier G, Li S, Luu-The V, Labrie F, 2007. Oestrogenic regulation of proopiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotrophin-releasing hormone mRNAs in mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 19:426-431.
- Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Arribas C, Andrés A, Ros M and Carrascosa JM, 2004. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53:347-53.
- Perry VH, Newman TA and Cunningham C, 2003. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 4:103-112.
- Peters M, Müller AM and Rose-John S, 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92:3495-504. Review.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, and Gustafsson JA, 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11:1486-1496.
- Pike AC, 2006. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism* 20:1-14.
- Pinteaux E, Inoue W, Schmidt L, Molina-Holgado F, Rothwell NJ and Luheshi GN, 2007. Leptin induces interleukin-1 $\beta$  release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J Neurochem* 102:826-33.
- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A and Besedovsky H, 1997. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research* 48:287-298.
- Plant TM and Shahab M, 2002. Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates. *Physiol Behav* 77:717-722.
- Plata-Salamán CR, Sonti G, Borkoski JP, Wilson CD and French-Mullen JM, 1996. Anorexia induced by chronic central administration of cytokines at estimated pathophysiological concentrations. *Physiol Behav* 60:867-875.
- Plotkin SR, Banks WA and Kastin AJ, 1996. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1  $\alpha$  across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 67:41-7.
- Polazzi E and Contestabile A, 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Reviews in the Neurosciences* 13:221-242.
- Polazzi E, Gianni T and Contestabile A, 2001. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. *Glia* 36:271-280.

- Popa C, Netea MG, Radstake TR, van Riel PL, Barrera P and van der Meer JW, 2005. Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64:1195-8.
- Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk A, Alanko L, Huhtaniemi I and Stenberg D, 2004. Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. *Eur J Endocrinol* 150:737-42.
- Porter MH, Arnold M and Langhans W, 1998. Lipopolysaccharide-induced anorexia following hepatic portal vein and vena cava administration. *Physiol Behav*, 64:581–584.
- Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW and Niswender KD. 2009. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1003-12.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE and Ridker PM, 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-34.
- Pratt WB and Toft DO, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
- Prendergast CT and Anderton SM, 2009. Immune Cell Entry to Central Nervous System-Current Understanding and Prospective Therapeutic Targets. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9:315-27.
- Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ and Houle JD, 1997. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol* 148:433-443.
- Price RH and Handa RJ, 2000. Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neuroscience Letters* 288:115-118.
- Priest CA, Roberts JL, 2000. Estrogen and tamoxifen differentially regulate beta-endorphin and cFos expression and neuronal colocalization in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 72:293-305.
- Prokai L and Simpkins JW, 2007. Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacology and Therapeutics* 114:1-12.
- Qin H, Roberts KL, Niyongere SA, Cong Y, Elson CO and Benveniste EN, 2007. Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia. *J Immunol*. 2007 179:5966-76.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ and Crews FT, 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55: 453-462.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R and Maratos-Flier E, 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-7.

Quan Y, Du J and Wang X, 2007. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-kappaB pathways. *J Neurosci Res* 85:3150-9.

Quintana A, Müller M, Frausto RF, Ramos R, Getts DR, Sanz E, Hofer MJ, Krauthausen M, King NJ, Hidalgo J and Campbell IL, 2009. Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183:2079-88.

Raber J, O'Shea RD, Bloom FE and Campbell IL, 1997. Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function by transgenic expression of interleukin-6 in the CNS of mice. *J Neurosci* 17:9473-80.

Raso GM, Pacilio M, Esposito E, Coppola A, Di Carlo R and Meli R, 2002. Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. *Br J Pharmacol* 137:799-804.

Ray D and Melmed S, 1997. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 18:206-228.

Ray P, Ghosh SK, Zhang DH and Ray A, 1997. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett* 409:79-85.

Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, and Levin ER, 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16:100-115.

Razandi M, Pedram A, Greene GL, and Levin ER, 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307-319.

Ricardo JA and Koh ET, 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26.

Rifas L, 1999. Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha. *Calcif Tissue Int* 64:1-7.

Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E and Flavell RA, 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 185:461-469.

Rivest S, 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429-39. Review.

Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J and Laflamme N, 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:22-38. Review.

- Rivest S, Torres G and Rivier C, 1992. Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1b on brain c-fos expression and neuroendocrine functions. *Brain Res* 587:13–23.
- Rivier C and Vale W, 1990. Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology* 127:849-856.
- Rocha M, Bing C, Williams G and Puerta M, 2004. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem* 15:328-334.
- Rodan GA and Martin TJ, 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514.
- Rodríguez EM, González CB and Delannoy L, 1979. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res Oct* 201:377-408.
- Rodríguez Gaspar M, Borregero León JM, González Reimers E, Viña Rodríguez JJ, Serrano García M and Santolaria Fernández F, 2010. Vascular risk factors and retinal occlusive disease. *Med Clin (Barc)* 134:95-100.
- Romeo HE, Tio DL, Rahman SU, Chiappelli F and Taylor AN, 2001. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J Neuroimmunol* 115:91-100.
- Rose-John S and Heinrich PC, 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300:281-90. Review.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, and Romas NA, 1999a. Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids* 64:100-106.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, and Romas NA, 1999b. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:481-485.
- Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA and Bloom SR, 1997. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* 138:351-5.
- Rothwell NJ, Busbridge NJ, Lefevre RA, Hardwick AJ, Gauldie J and Hopkins SJ, 1991. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1465-9.
- Rune GM, 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97:1136-44.
- Rungger-Brändle E, Dosso AA and Leuenberger PM, 2000. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:1971-80.



- Russo IH and Russo J, 1998. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61.
- Sachot C, Poole S and Luheshi GN, 2004. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *J Physiol* 561:263-72.
- Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T and Kishimoto T, 1992. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 148:4066-71.
- Sakić B, Szechtman H, Braciak T, Richards C, Gauldie J and Denburg JA, 1997. Reduced preference for sucrose in autoimmune mice: a possible role of interleukin-6. *Brain Res Bull* 44:155-65.
- Saladin R, DeVos O, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B and Auwerx J, 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529.
- Sánchez-Criado JE, de Las Mulas JM, Bellido C, Navarro VM, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Malagón MM, Tena-Sempere M and Blanco A, 2006. Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for ERbeta in the gonadotrope?. *J Endocrinol* 188:167-77.
- Sánchez-Margalet V, Fernández-Riejos P, González-Yanes C and Santos-Álvarez J, 2006. Leptina y sistema inmune. *Rev Esp Obes* 4: 221-230.
- Sánchez-Margalet V, Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S and Gonzalez-Yanes C, 2003. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 133:11-9. Review.
- Santos-Alvarez J, Goberna R and Sánchez-Margalet V, 1999. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194:6-11.
- Santos M JL, 2009. Leptin-melanocortin system, body weight regulation and obesity. *Rev Med Chil* 137:1225-34.
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P and Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238:522–524, 1987.
- Sarder M, Abe K, Saito H and Nishiyama N, 1996. Comparative effect of IL-2 and IL-6 on morphology of cultured hippocampal neurons from fetal rat brain. *Brain Res* 715:9-16.
- Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL and Alexander HR, 1997. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 185:171-5.

Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR and Skibo GG, 2000. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:195-203.

Sawada M, Itoh Y, Suzumura A and Marunouchi T, 1993. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci. Lett* 160:131-134.

Sawada M, Suzumura A, and Marunouchi T, 1995. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci* 13:253-264.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK and Baldwin AS Jr, 1995. Role of transcriptional activation of I-kBa in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270:283-286.

Scheurink AJ, Balkan B, Strubbe JH, van Dijk G and Steffens AB, 1996. Overfeeding, autonomic regulation and metabolic consequences. *Cardiovasc Drugs Ther* 10:263-73.

Schiltz JC and Sawchenko PE, 2002. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* 22:5606-5618.

Schirmacher P, Peters M, Ciliberto G, Blessing M, Lotz J, Meyer zum Buschenfelde KH and Rose-John S, 1998. Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. *Am J Pathol* 153:639-648.

Schöbitz B, De Kloet ER and Holsboer F, 1994. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog Neurobiol.* 44:397-432. Review.

Schöbitz B, De Kloet ER, Sutanto W and Holsboer F, 1993. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 5:1426-35.

Schöbitz B, Pezeshki G, Pohl T, Hemmann U, Heinrich PC, Holsboer F and Reul JM, 1995. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J* 9:659-64.

Schöbitz B, Voorhuis DA and De Kloet ER, 1992. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136:189-92.

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC and Porte D Jr, 1992. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414. Review.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P and Baskin DG, 1996. Identification of hypothalamic targets of leptin action. *J Clin Invest* 98:1101-6.

Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ Jr, Bergman RN, Woods SC and Porte D Jr, 1990. Kinetic and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 259:E378–E383.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ and Baskin DG, 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-71.

Seeley RJ, Drazen DL and Clegg DJ, 2004. The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. *Annu Rev Nutr* 24:133-49. Review.

Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC and Schwartz MW, 1996. Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 28:664-8.

Segal JP, Stallings NR, Lee CE, Zhao L, Socci N, Viale A, Harris TM, Soares MB, Childs G, Elmquist JK, Parker KL and Friedman JM, 2005. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci* 25:4181-8.

Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L and Heneka MT, 2005. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30:144-157.

Sharp BM, Matta SG, Peterson PK, Newton R, Chao C and Mcallen K, 1989. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1  $\beta$ . *Endocrinology* 124:3131-3.

Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y and Mori M, 1996. Estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett* 204:81-84.

Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N and Mori M, 1997. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154:285–292.

Shizuya K, Komori T, Fujiwara R, Miyahara S, Ohmori M and Nomura J, 1998. The expressions of mRNAs for interleukin-6 (IL-6) and the IL-6 receptor (IL-6R) in the rat hypothalamus and midbrain during restraint stress. *Life Sci* 62:2315-20.

Shoelson SE, Lee J and Goldfine AB, 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 116, 1793–1801.

Shozu M, Zhao Y and Simpson ER, 1997. Estrogen biosynthesis in THP1 cells is regulated by promoter switching of the aromatase (CYP19) gene. *Endocrinology* 138:5125-35.

Shughrue PJ, Lane MV and Merchenthaler I, 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-25.

- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Lüthy R and Stark KL, 1997. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11:593-602.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore A, McEwen BS and Bulloch K, 2007. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55:412-424.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS and Bulloch K, 2008. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* 56:659-674.
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardeña G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ and Flores-Riveros JR, 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-6.
- Silveyra P, Cataldi NI, Lux-Lantos VA and Libertun C, 2010. Role of orexins in the hypothalamic-pituitary-ovarian relationships. *Acta Physiol (Oxf)* 198:355-60.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, and Liao JK, 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541.
- Simpson ER, 1998. Genetic mutations resulting in estrogen insufficiency in the male. *Mol Cell Endocrinol* 145: 55-59. Review.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, and Dorsa DM, 1999. The mitogenactivated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19:2455-2463.
- Singh M, Setalo G, Jr., Guan X, Frail DE, and Toran-Allerand CD, 2000. Estrogen induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci* 20:1694-1700.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW and Caro JF, 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98:1277-82.
- Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA and Boden G, 1998. Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 179:1128-1132.
- Sklar EM, Schatz NJ, Glaser JS, Post MJ and ten Hove M, 1996. MR of vasculitis-induced optic neuropathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 17:121-8.
- Skofitsch G, Jacobowitz DM and Zamir N, 1985. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull* 15:635-49.
- Slepko N, Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A and Levi G, 1997. Reorientation of prostanoid production accompanies "activation" of adult microglial cells in culture. *J Neurosci Res* 49:292-300.

- Smith BK and Kluger MJ, 1993. Anti-TNF- $\alpha$  antibodies normalized body temperature and enhanced food intake in tumor-bearing rats. *Am J Physiol* 265:R615-9.
- Smith JT, Achohido BV, Clifton DK and Steiner RA, 2006. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J. Neuroendocrinol.* 18, 298-303.
- Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z and Keller ET, 2001. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:33-40.
- Soulet D and Rivest S, 2008. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* 8:508-18. Review.
- Spiegelman BM and Hotamisligil GS, 1993. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF  $\alpha$ . *Cell* 73:625-627.
- Spinedi E, Hadid R, Daneva T, and Gaillard RC, 1992. Cytokines stimulate the CRH but not the vasopressin neuronal system: evidence for a median eminence site of interleukin-6 action. *Neuroendocrinology* 56, 46-53.
- Stanley BG and Leibowitz SF, 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3940-3.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S and Leibowitz SF, 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189-92.
- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS and Katzenellenbogen JA, 2000. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- $\alpha$ -selective agonists. *J Med Chem.* 43:4934-47.
- Stein B and Yang MX, 1995. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 15:4971-9.
- Stenlöf K, Wernstedt I, Fjällman T, Wallenius V, Wallenius K and Jansson JO, 2003. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4379-83.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A and et al, 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530-2.
- Sterio DC, 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127-136.
- Sternberg EM, 1997. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 100:2641-7. Review.

- Stofkova A, Skurlova M, Kiss A, Zelezna B, Zorad S and Jurcovicova J, 2009. Activation of hypothalamic NPY, AgRP, MC4R, AND IL-6 mRNA levels in young Lewis rats with early-life diet-induced obesity. *Endocr Regul* 43:99-106.
- Stovall DW, Utian WH, Gass ML, Qu Y, Muram D, Wong M and Plouffe L, 2007. The effects of combined raloxifene and oral estrogen on vasomotor symptoms and endometrial safety. *Menopause* 14:510-517.
- Streit WJ, Walter SA and Pennell NA, 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-81. Review.
- Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A and Salminen A, 2005 Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflammation Research* 54:194-203.
- Suzuki S, Brown CM and Wise PM, 2006. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29:209-215.
- Suzuki S, Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, Bridwell DA and Wise PM, 2007. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *PNAS* 104:6013-6018.
- Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R and Mizuno T, 2006. Roles of gliaderived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088:219-229.
- Swanson LW and Sawchenko PE, 1980. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410-7.
- Szanto I and Kahn CR, 2000. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2355-60.
- Taga T and Kishimoto T, 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819. Review.
- Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T and Kishimoto T, 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-81.
- Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T and Inoue M, 2004. Expression of estrogen receptor-b in the postischemic monkey hippocampus. *Neuroscience Letters* 369: 9-13.
- Tang CH, Lu DY, Yang RS, Tsai HY, Kao MC, Fu WM and Chen YF, 2007. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia. *J Immunol* 179:1292-302.
- Tartaglia LA, 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6. Review.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA and Tepper RI, 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-71.

Taylor JA, Goubillon M-L, Broad KD and Robinson JE, 2007. Steroid control of gonadotropin-releasing hormone secretion: associated changes in proopiomelanocortin and preproenkephalin messenger RNA expression in the ovine hypothalamus. *Biol Reprod* 76:524-531.

Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Huhtaniemi I and Aguilar E, 2001. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 170:413-23.

Tena-Sempere M, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Casanueva FF and Aguilar E, 1999. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 161:211-8.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A and Heinen E, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291-5.

Thomas WE, 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17:61-74.

Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, and Steiner RA, 1997. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138:5063-5066.

Thornton JE, Loose MD, Kelly MJ and Rønnekleiv OK, 1994. Effects of estrogen on the number of neurons expressing b-endorphin in the medial basal hypothalamus of the female guinea pig. *J Comp Neurol* 341:68-77.

Tian DR, Li XD, Shi YS, Wan Y, Wang XM, Chang JK, Yang J and Han JS, 2004. Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* 25:2147-53.

Tomaszewska-Zaremba D and Herman A, 2009. The role of immunological system in the regulation of gonadoliberin and gonadotropin secretion. *Reprod Biol* 9:11-23. Review.

Trayhurn P, 2005. Endocrine and signaling role of adipose tissue: New perspective on fat. *Acta Physiol Scand* 184:285-293.

Tu H, Kastin AJ, Hsueh H and Pan W, 2008. Soluble receptor inhibits leptin transport *J Cell Physiol* 214:301-5.

Turnbull AV and Rivier CL, 1999. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71. Review.

Tritos NA, Kokkinos A, Lampadariou E, Alexiou E, Katsilambros N and Maratos-Flier E, 2003. Cerebrospinal fluid ghrelin is negatively associated with body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88:2943-2946.

Ueda T, Bruchovsky N and Sadar MD, 2002. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 277:7076-7085.

Ulloa L, 2005. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* 4:673-84.

Unno Y, Akuta T, Sakamoto Y, Horiuchi S and Akaike T, 2006. Nitric oxide-induced downregulation of leptin production by 3T3-L1 adipocytes. *Nitric Oxide* 15:125-32.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M and Friedman JM, 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14:95-7.

Valassi E, Scacchi M and Cavagnini F, 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:158-68. Review.

Vallières L and Rivest S, 1997. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* 69:1668-83.

Vallières L and Rivest S, 1999. Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. *Endocrinology* 140:3890-903.

Vázquez LA, Pazos F, Berrazueta JR, Fernández-Escalante C, García-Unzueta MT, Freijanes J and Amado JA, 2005. Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 90:316-22.

Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P and Maggi A, 2003. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9614-9.

Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S and Maggi A, 2006. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147:2263-2272.

Vegeto E, Benedusi V and Maggi A, 2008. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* 29:507-19.



Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P and Maggi A, 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide- induced inflammatory response in microglia. *Journal of Neuroscience* 21:1809-1818.

Velloso LA, Araújo EP and de Souza CT, 2008. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 15:189-93. Review.

Vitkovic L, Bockaert J and Jacque C, 2000. “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457–471.

Vollenweider F, Herrmann M, Otten U and Nitsch C, 2003. Interleukin-6 receptor expression and localization after transient global ischemia in gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 341:49-52.

von Meyenburg C, Langhans W and Hrupka BJ, 2003. Evidence for a role of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor in central lipopolysaccharide-, interleukin-1 beta-, and leptin-induced anorexia. *Pharmacol Biochem Behav* 74:1025-31.

Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Kozlowski PB, Rabe A, Tarnawski M and Lee MH, 2005. Immunogold study of effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide and/or valproic acid on the rat blood-brain barrier vessels. *J Neurocytol* 34:435-46.

Wade CB and Dorsa DM, 2003. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:832-838.

Wallenius K, Jansson JO and Wallenius V, 2003. The therapeutic potential of interleukin-6 in treating obesity. *Expert Opin Biol Ther* 3:1061-70.

Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL and Jansson JO, 2002b. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 293:560-5.

Wallenius V, Wallenius K, Åhrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C and Jansson JO, 2002a. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75-9.

Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ and Tracey KJ, 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421:384-8.

Wang P, Rothwell NJ, Pinteaux E and Brough D, 2008. Neuronal injury induces the release of pro-interleukin-1beta from activated microglia in vitro. *Brain Res* 1236:1-7.

Wang WG, Chen X, Jiang H and Jiang ZY, 2008. Effects of ghrelin on glucose-sensing and gastric distension sensitive neurons in rat dorsal vagal complex. *Regul Pept* 146:169-75.

- Wang XJ, Ye M, Zhang YH and Chen SD, 2007. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2:259-64.
- Watanobe H, 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* 545:255-268.
- Watanobe H and Hayakawa Y, 2003. Hypothalamic interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  but not interleukin-6 mediate endotoxin induced suppression of the reproductive axis in rats. *Endocrinology* 144 4868-4875.
- Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, and Dorsa DM, 1997. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033.
- Weibel ER, 1979. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 15:999-1013.
- West DB and York B, 1998. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 67: 505S–512S.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC and Harrold JA, 2004. Anabolic neuropeptides. *Physiol. Behav* 81:211–222.
- Wisse BE, Ogimoto K and Schwartz MW, 2006. Role of hypothalamic interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in regulation of energy homeostasis by melanocortins. *Peptides* 27:265-73. Review.
- Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG and Seeley RJ, 2000. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51:255–77.
- Woolley CS, 2007. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47 657-680. Review.
- Yager JD and Davidson NE, 2006. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354:270-82. Review.
- Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T and Kishimoto T, 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN  $\beta$  2) receptor. *Science* 241:825-8.
- Yang J, Wang Y, Gao Y, Shao J, Zhang XJ and Yao Z, 2009. Reciprocal regulation of 17 $\beta$ -estradiol, interleukin-6 and interleukin-8 during growth and progression of epithelial ovarian cancer. *Cytokine* 46:382-91.
- Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Horgan MM, Powderly WG, Santiago JV and Landt M, 1997. Serum leptin concentrations in human immunodeficiency virus-infected men with low adiposity. *Metabolism* 46:303-5.

Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L and Buijs RM, 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147:283-94.

You S, Götz F, Rohde W and Dörner G, 1990. Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol* 96:301-6.

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S and McCann SM, 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1023-1028.

Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB and Neel BG, 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2:489-95.

Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK and Brann DW, 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65:223-8.

Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F and Jeanrenaud B, 1993. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133:1753-8.

Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ and Ross RJ, 2001. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol* 167:4593-9.

Zeitlin L, Segev E, Fried A and Wientroub S, 2003. Effects of long-term administration of N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and selective estrogen receptor modulator (SERM) derivatives in ovariectomized (OVX) mice. *J Cell Biochem* 90:347-60.

Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP and Schevitz RW, 1997. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387:206-9.

Zhang MZ and McKanna JA, 1997. Gliogenesis in postnatal rat optic nerve: LC1 + microglia and S100-beta + astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* 101:27-36.

Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H and Cai D, 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135: 61.73.

Zhang Y, Jin Y, Behr MJ, Feustel PJ, Morrison JP and Kimelberg HK, 2005. Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 196:41-46.

Zhang Y, Proenca R, MaVei M, Barone M, Leopold L and Friedman J M, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

Zhao C, Dahlman-Wright K and Gustafsson JA, 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. Nucl Recept Signal 6:e003.

Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR and Appel SH, 2006. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. J Neurochem 99:1176-87.

Zhu JN and Wang JJ, 2008. The cerebellum in feeding control: possible function and mechanism. Cell Mol Neurobiol 28:469-78. Review.

Zigmond RE and Sun Y, 1997. Regulation of neuropeptide expression in sympathetic neurons. Paracrine and retrograde influences. Ann N Y Acad Sci 814:181-97.

Zohlnhofer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E and Heinrich PC, 1992. The hepatic interleukin-6 receptor: Downregulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. FEBS Lett 306:219-222.

Zuurman MW, Heeroma J, Brouwer N, Boddeke HW and Biber K, 2003. LPS-induced expression of a novel chemokine receptor (L-CCR) in mouse glial cells in vitro and in vivo. Glia 41:327-336.